

**Untersuchungen zur humoralen Immunantwort gegen das
Hitze-Schock-Protein 60 von *Chlamydia pneumoniae* bei
Koronarer Herzkrankheit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Cathrin Krombach aus Gießen
Gießen 2004

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie,
Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen

Leiter: Prof. Dr. T. Chakraborty

1. Gutachter: PD Dr. C. A. Jantos

2. Gutachter: PD Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 26.04.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1.	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	5
2.	ZUSAMMENFASSUNG	6
3.	EINLEITUNG	12
3.1	Chlamydien – ein Überblick	12
3.2	<i>Chlamydia pneumoniae</i> – Charakteristika und Krankheitsbilder	15
3.3	<i>Chlamydia pneumoniae</i> und Atherosklerose	16
3.4	Hitze – Schock – Proteine (HSP)	20
3.5	Ziel dieser Arbeit	22
4.	MATERIALIEN	23
4.1	Zellen	23
4.1.1	Prokaryotische Zellen	23
4.1.1.1	<i>Chlamydia pneumoniae</i> ; GiD	23
4.1.1.2	<i>E. coli</i>	23
4.1.2	Eukaryotische Zellen	23
4.1.2.1	HEp-2-Zelllinie	23
4.2	Chemikalien	23
4.3	Antikörper	24
4.4	Medien und Waschlösungen	25
4.4.1	Zell- und Chlamydienkulturmedium	25
4.4.2	Mediumzusätze, Waschlösung und Enzyme	25
4.5	Kits	25
4.6	Gebrauchsartikel	26
4.7	Geräte	26
5.	METHODEN	27
5.1	Kultivierung von HEp-2 Zellen	27
5.1.1	Herstellung des Wachstumsmediums für HEp-2 Zellen	27
5.1.2	Herstellung der Stammlösungen für das Wachstumsmedium	27
5.1.2.1	Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums (FKS)	27
5.1.2.2	Herstellung der Glucoselösung	28
5.1.2.3	Herstellung der übrigen Bestandteile des Wachstumsmediums	28
5.1.3	Herstellung der Gebrauchslösungen für die Zellkultur	28
5.1.3.1	0,5 x Trypsin / EDTA	28
5.1.4	Auftauen von HEp-2 Zellen	28
5.1.5	Trypsinbehandlung von HEp-2 Zellen	29
5.1.6	Passagieren von HEp-2 Zellen	29
5.1.6.1	Passage in Gewebekulturröhrchen (GKs)	29
5.1.6.2	Passage in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm ²)	30
5.1.6.3	Passage in großen Zellkulturflaschen (80 cm ²)	30
5.1.7	Einfrieren von HEp-2 Zellen	30
5.2	Kultur von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	31

5.2.1	Herstellung des Wachstumsmediums für Chlamydien	31
5.2.2	Herstellung der Stammlösungen für die Chlamydienkultur	31
5.2.2.1	Cycloheximid	31
5.2.2.2	Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer)	31
5.2.2.3	Einfriermedium für Chlamydien	31
5.2.2.4	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	32
5.2.3	Auftauen von Chlamydien	32
5.2.4	Passage von Chlamydien in Gewebekulturröhrchen (GKs)	32
5.2.5	Passage von Chlamydien in Kulturflaschen (25 cm ²)	33
5.2.6	Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien	34
5.2.7	Chlamydien-Nachweis	34
5.2.7.1	Nachweis mittels Phasenkontrastmikroskopie	34
5.2.7.2	Nachweis mittels Immunofluoreszenz	35
5.2.7.2.1	Direkter immunologischer Nachweis	35
5.2.7.2.2	Indirekter immunologischer Nachweis	36
5.2.8	Reinigung einer Chlamydien suspension über 30 % Urografin®	37
5.2.9	Proteinmengenabschätzung einer Chlamydien suspension	37
5.3	Chlamydien-IgG-ELISA	38
5.3.1	Durchführung	38
5.4	Hitze-Schock-Protein (HSP) – Enzymimmunoassay	39
5.4.1	Reagenzien	39
5.4.1.1	Beschichtungs-Puffer	39
5.4.1.2	Waschpuffer	40
5.4.1.3	Verdünnungspuffer	40
5.4.1.4	Blockierungspuffer	40
5.4.1.5	Citrat-Phosphat-Puffer	40
5.4.1.5.1	Stammlösung A und B	40
5.4.1.5.2	Gebrauchslösung	40
5.4.1.6	Substratlösung	41
5.4.2	Herstellung des gereinigten, rekombinanten HSP-60 von <i>C. pneumoniae</i>	41
5.4.3	Durchführung	41
5.5	Mikroimmunfluoreszenztest (MIF)	42
5.5.1	Antigen- und Antikörperpräparation, Verdünnung der Serumproben	42
5.5.1.1	Herstellung der Antigensuspension	42
5.5.1.2	Herstellung der Antikörper-Lösung	43
5.5.1.3	Verdünnung der Serum-Proben	44
5.5.1.4	Durchführung des Mikroimmunfluoreszenztestes (MIF) für IgG	44
5.5.1.5	Durchführung des Mikroimmunfluoreszenztestes (MIF) für IgM	44
5.5.1.6	Ergebniserfassung des MIF	45
5.6	Immunoblotting	46
5.6.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	46
5.6.1.1	Herstellung der Gebrauchslösungen	46
5.6.1.1.1	Kathodenpuffer (10 x)	46
5.6.1.1.2	Anode-1-Puffer (10 x)	46
5.6.1.1.3	Anode-2-Puffer (10 x)	46

5.6.1.1.4.	Lysis-Puffer (1 x).....	47
5.6.1.2	Herstellung der Antigen-Suspension	47
5.6.1.3	Herstellung der Standard-Molekulargewicht-Marker.....	47
5.6.1.3.1.	Herstellung des Low-Molecular-Weight (LMW)-Markers (Pharmacia).....	47
5.6.1.3.2.	Herstellung des biotinylierten SDS-Standard-Markers (Bio-Rad)	48
5.6.1.4	Herstellung eines SDS-Trenngels.....	48
5.6.1.5	Herstellung eines SDS-Sammelgels	49
5.6.1.6	Elektrophorese	49
5.6.2	Färbung eines SDS-Gels mit Coomassie-Blau	50
5.6.2.1	Herstellung der Lösungen für die Coomassie-Färbung	50
5.6.2.1.1.	Coomassie-Blau-Lösung	50
5.6.2.1.2.	Entfärber	50
5.6.2.1.3.	Fixierer	50
5.6.2.2	Durchführung der Färbung	51
5.6.3	Semidry-Electroblotting	51
5.6.3.1	Reagenzien	51
5.6.3.1.1.	Blot-Waschpuffer (10 x).....	51
5.6.3.1.2.	Blot-Verdünnungspuffer (1 x).....	51
5.6.3.1.3.	Blot-Blockierungspuffer (10 x)	52
5.6.3.2	Durchführung des Blotvorganges.....	52
5.6.4	Immunoblot-Entwicklung.....	53
5.6.4.1	Reagenzien	53
5.6.4.1.1.	Blot-Waschpuffer (10 x).....	53
5.6.4.1.2.	Blot-Verdünnungspuffer (1 x).....	53
5.6.4.1.3.	Diaminobenzidin-Entwicklerlösung.....	54
5.6.4.2	Durchführung	54
5.6.5	Immunoblot-Auswertung.....	55
5.7	Berechnung des Gensini-Scores	56
5.8	Statistische Auswertung	56
5.9	Serologische Stufendiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Koronare Herzkrankheit	57
6.	ERGEBNISSE	59
6.1	Chlamydienkultur	59
6.2	Charakteristika des Patientenkollektivs.....	60
6.2.1	Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	60
6.2.2	Koronarangiographischer Befund.....	61
6.3	Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen <i>Chlamydia pneumoniae</i>	63
6.3.1	Nachweis gegen chlamydiales Lipopolysaccharid (LPS) gerichteter Immunglobuline der Klasse G (IgG) mittels Enzymimmunoassay (EIA)	63
6.3.2	Nachweis von Immunglobulinen der Klasse M und G gegen <i>Chlamydia</i> <i>pneumoniae</i> mittels Mikroimmunfluoreszenztest (MIF).....	63
6.3.2.1	Nachweis von IgG-Antikörpern	63
6.3.2.2	Nachweis von IgM-Antikörpern.....	64
6.4	<i>C. pneumoniae</i> -Seropositivität und Koronare Herzkrankheit.....	64

6.4.1	Serumantikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein (HSP)	65
6.4.1.1	Darstellung des gereinigten Hitze-Schock-Proteins 60 von <i>C. pneumoniae</i> ..	66
6.4.1.2	Nachweis von IgG-Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 mittels Enzymimmunoassays (EIA).....	66
6.4.1.3	Nachweis von Immunglobulinen der Klasse IgG gegen chlamydiales Hitze- Schock-Protein 60 mittels Immunoblots	67
6.4.2	HSP-Antikörper und Koronare Herzkrankheit	67
6.4.2.1	Zusammenhang zwischen HSP-Blot und Koronarer Herzkrankheit	67
6.4.2.2	Zusammenhang zwischen Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock- Protein 60 und Myokardinfarkt	68
6.4.2.3	Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit und Konzentration der Hitze- Schock-Protein 60-Antikörper.....	69
6.5	Immunoblot-Ergebnisse	70
6.5.1	Reaktionsbandenmuster innerhalb des gesamten Patientenkollektivs	70
6.5.2	Immunoblots von Patienten mit und ohne Koronare Herzkrankheit	72
6.5.2.1	Immunoblot-Befund bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit	72
6.5.2.2	Immunoblot-Befund bei Patienten ohne Koronare Herzkrankheit	73
6.5.3	Immunantwort gegen häufig detektierte <i>C. pneumoniae</i> -Proteine und KHK ...	74
6.5.3.1	Major Outer Membrane Protein (MOMP).....	74
6.5.3.1.1.	Allgemeines	74
6.5.3.1.2.	MOMP und Immundominanz.....	75
6.5.3.1.3.	Anti-MOMP-Antikörper und Koronare Herzkrankheit.....	76
6.5.3.2	Immunantwort gegen das 62 kDa-Protein	77
6.5.3.3	Immunantwort gegen das 60 kDa-Protein	79
6.5.3.4	Immunantwort gegen das 58 kDa-Protein	80
6.5.3.5	Immunantwort gegen das 17 kDa-Protein	81
7.	DISKUSSION	82
7.1	Atherogenese und <i>C. pneumoniae</i> -Infektion	82
7.2	Serologischer Nachweis einer Infektion durch <i>C. pneumoniae</i> und Koronare Herzkrankheit	86
7.3	Immunoblotanalyse und Koronare Herzkrankheit.....	94
7.4	Hitze-Schock-Protein 60 – Verbindungsglied zwischen einer Infektion mit <i>C. pneumoniae</i> und der Atherosklerose ?.....	101
7.5	Atherosklerose, Infektionen mit <i>C. pneumoniae</i> und klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren	115
8.	LITERATURVERZEICHNIS	118
9.	DANKSAGUNG.....	128
10.	LEBENS LAUF.....	130

1. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

A	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
CMV	Cytomegalievirus
C.	<i>Chlamydia</i>
CRP	C-reaktives Protein
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EIA	Enzymimmunoassay
Fe	Eisen
HDL	High Density Lipoprotein
HSP	Hitze-Schock-Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM	Intracellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
Ig A	Immunglobulin der Klasse A
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL	Interleukin
INF	Interferon
KHK	Koronare Herzkrankheit
konz.	konzentriert
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Mikroimmunfluoreszenztest
MOMP	Major Outer Membrane Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
SPSS	Eigenname für statistisches Softwareprogramm
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - alpha
TWAR	Eigenname für <i>Chlamydia pneumoniae</i>
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
vs.	versus

2. ZUSAMMENFASSUNG

Die Atherosklerose und ihre Manifestationsformen wie Koronare Herzkrankheit mit möglichem Myokardinfarkt, zerebrovaskuläre Verschlusskrankheit und gegebenenfalls nachfolgendem Apoplex oder auch periphere arterielle Verschlusskrankheit stellen die Ursache von ca. 50 % der Gesamtmortalität in Europa, Japan und den USA dar.

Die entscheidende Rolle der bekannten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren - wie beispielsweise Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus oder arterielle Hypertonie im Rahmen der Atherogenese - ist unbestritten. Seit Ende der 80-er Jahre wird jedoch die Hypothese, dass möglicherweise ein infektiöses Geschehen mitverursachend oder sogar die Hauptursache im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose sein könnte, zunehmend diskutiert. Insbesondere steht hierbei *Chlamydia (C.) pneumoniae*, ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, welches als Erreger respiratorischer Infektionen bekannt ist, als möglicher verursachender Mikroorganismus im Vordergrund der Diskussion.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und einer Infektion durch *C. pneumoniae* näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie Seren von insgesamt 752 Patienten untersucht, bei denen eine invasive Abklärung (Koronarangiographie) hinsichtlich des Vorliegens einer Koronaren Herzkrankheit durchgeführt worden war. Es erfolgte die Analyse, inwieweit der Nachweis positiver serologischer Marker einer *C. pneumoniae*-Infektion mit dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit korrelierte.

Die Seren aller Patienten wurden zunächst mit Hilfe eines Enzymimmunoassays, welcher Antikörper gegen ein genusspezifisches chlamydiales Lipopolysaccharid nachweist, einer Analyse unterzogen, um Patienten mit einer durchgemachten chlamydialen Infektion von denen ohne eine solche Infektion zu unterscheiden. Hierbei gelang bei insgesamt 451 Patienten (60 %) der Nachweis von Antikörpern gegen chlamydiales Lipopolysaccharid. Allerdings wurden mit dem Enzymimmunoassay auch Patienten mit einer durchgemachten Infektion durch *C. trachomatis* oder *C. psittaci* erfasst. Um eine weitere Differenzierung

hinsichtlich einer speziell durch *C. pneumoniae* verursachten Infektion durchzuführen, erfolgte die weitere Untersuchung nur der im Enzymimmunoassay als positiv getesteten Seren mit dem sog. Mikroimmunfluoreszenztest. Dieser erlaubt den speziesspezifischen Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae*. Bei insgesamt 428 (57 %) der getesteten Patientenseren fiel er positiv aus. Es wurde anschließend untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* Antikörpern und einer angiographisch nachgewiesenen Koronaren Herzkrankheit vorlag. Tatsächlich gelang es, solch eine signifikante Korrelation zu finden: Es wurde bei 292 (68 %) von insgesamt 428 Patienten, die im Mikroimmunfluoreszenztest einen IgG-Titer von $\geq 1:16$ aufwiesen, eine Koronare Herzkrankheit (KHK) mit einer ≥ 50 %-igen Stenose nachgewiesen. Demgegenüber standen 136 Patienten (32 %) ohne nachgewiesene KHK (≤ 50 % Stenose) und einem positiven IgG-Mikroimmunfluoreszenztest ($p = 0,007$).

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit hatte zum Ziel, mittels Immunoblot-Analyse Reaktionsbandenmuster zu identifizieren, die möglicherweise in typischer Weise bei an Koronarer Herzkrankheit erkrankten Patienten zu beobachten sind. Es konnte hierbei eine große Vielfalt von Reaktionsbanden im Bereich der Proteingrößen 17-100 kDa nachgewiesen werden - jedoch ohne signifikante Korrelation eines spezifischen Musters oder des gehäuften Nachweises einer spezifischen Bande mit der Koronaren Herzkrankheit.

Im Falle einer Involvierung von *C. pneumoniae* in die Pathogenese der Atherosklerose stellt sich ferner die Frage nach dem zu Grunde liegenden Pathomechanismus. Es werden vor allem die sog. Hitze-Schock-Proteine als „Verbindungsglieder“ diskutiert. Sie sind in der Natur weit verbreitet und werden von (pro- und eukaryontischen) Zellen im Falle von Stresssituationen (mechanische Irritationen, Hitze, Infektionen etc.) vermehrt produziert. Die entscheidende Eigenschaft, aufgrund derer eine Involvierung im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert wird, ist die große Sequenzhomologie (> 50 %) zwischen den Hitze-Schock-Proteinen menschlicher, pflanzlicher, tierischer und bakterieller Organismen. Hierdurch wird ein Pathomechanismus in Form einer Autoimmunreaktion denkbar: Eine ursprünglich gegen das pathogene

Agens gerichtete humorale oder zelluläre Immunreaktion richtet sich im Verlauf als Kreuzreaktion fälschlicherweise gegen körpereigene Epitope. Diskutiert wird als möglicher Auslöser einer autoimmunologischen Ursache der Atherosklerose vor allem das von *C. pneumoniae* stammende Hitze-Schock-Protein 60. Seine mögliche Korrelation mit der Koronaren Herzkrankheit war ein weiterer wesentlicher Aspekt der vorliegenden Studie. Es wurde analysiert, ob der angiographische Nachweis einer koronaren Atherosklerose signifikant mit dem Nachweis von Antikörpern gegen das chlamydiale Hitze-Schock-Protein 60 korreliert. Hierzu wurden alle Patientenserumproben, die im Mikroimmunfluoreszenztest als positiv bewertet worden waren, mittels Immunoblotanalyse und Enzymimmunoassay auf eine Reaktion gegen gereinigtes, rekombinantes, chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 getestet. Es konnte allerdings keine signifikante Korrelation gefunden werden:

So gelang bei 29 % der an Koronarer Herzkrankheit erkrankten und bei 30 % der koronargesunden Patienten der Nachweis von Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 ($p = 0,751$).

Darüber hinaus wurde eine Analyse bezüglich des Schweregrades der Koronaren Herzkrankheit (Ein-, Zwei-, Dreifäßerkrankung) und dem gleichzeitigen Vorhandensein von Antikörpern gegenüber dem Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* angefertigt. Auch hierbei war keine signifikante Korrelation nachweisbar. Schließlich konnte ebenso kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem positiven Nachweis von Antikörpern gegenüber dem Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* und einem früheren Myokardinfarkt festgestellt werden ($p = 0,458$), wie sich auch ferner kein Anhalt für eine Korrelation zwischen der Antikörperkonzentration und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit finden ließ.

Insgesamt scheint aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie ein Zusammenhang einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose möglich – gelang doch bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit der signifikant häufigere Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae*. Es muss jedoch diskutiert werden, inwieweit der alleinige Nachweis von Antikörpern ein „echter“ Hinweis für einen kausalen Zusammenhang ist. Denn so belegt eine signifikante Korrelation zwischen Koronarer Herzkrankheit und nachgewiesenen

serologischen Merkmalen einer *C. pneumoniae*-Infektion keinesfalls einen ätiologischen Zusammenhang, erlaubt also nicht die Unterscheidung zwischen der Rolle von *C. pneumoniae* als Ursache oder als Epiphänomen.

Die fehlende Assoziation zwischen der serologischen Immunantwort gegen das HSP-60 und der Koronaren Herzkrankheit spricht gegen eine mögliche Beteiligung des HSP-60 an der Atherogenese.

SUMMARY

Atherosclerosis and its manifestations such as coronary artery disease with possible myocardial infarction, cerebrovascular disease and possible apoplexy or peripheral artery disease are the reason for about 50 % of the whole mortality in Europe, Japan and the USA.

The decisive role of the classical cardiovascular risk factors as for example hyperlipoproteinemia, nicotin or arterial hypertension concerning atherogenesis is undisputed. Since the end of the eighties the hypothesis that an infection plays an important role or even the main role in the pathogenesis has more and more been discussed. Especially *Chlamydia pneumoniae*, a gram-negative, obligate intracellular bacterium, which is known as the pathogen of respiratory tract infections has been discussed as the main microorganism causing it.

To examine the possible relation between atherosclerosis and an infection caused by *C. pneumoniae*, in this study 752 sera of patients undergoing a coronary angiography were examined. It was analysed, if the positive proof of serological markers of an infection caused by *C. pneumoniae* correlates with coronary artery disease.

At first the sera of all patients were examined by means of an enzyme immunoassay, which proved antibodies against genus-specific chlamydial lipopolysaccharide in order to distinguish between sera of patients who had had and had not had a chlamydial infection. In case of 451 patients (60 %) the proof of antibodies against chlamydial lipopolysaccharide was confirmed. But by means of this test also patients who had suffered from an infection with

C. trachomatis and *C. psittaci* were registered. To get the information which of these infections had especially been caused by *C. pneumoniae* all sera with a positive result in the enzyme immunoassay were further examined by the microimmunofluorescence (MIF) test. This test makes it possible to recognize species-specific antibodies against *C. pneumoniae*. In case of 428 (57 %) of the tested sera the MIF test was positive. Then it was analysed if there was a correlation between a positive result in the MIF test and a coronary artery disease. In fact there was a significant correlation: 292 (68 %) of the 428 patients with an antibody titer (IgG) $\geq 1:16$ suffered from a coronary artery disease. On the other hand 136 patients (32 %) without a coronary artery disease (angiostenosis $\leq 50\%$) showed a positive result in the MIF test ($p = 0,007$).

Another aim of this study was to examine by means of immunoblot analyses if a special pattern of reaction bands are especially found with patients suffering from coronary artery disease. A great variety of reaction bands of protein sizes of 17 - 100 kDa were detected - but without a significant correlation between a specific pattern or a specific reaction band and coronary artery disease.

In case of the involvement of *C. pneumoniae* in the pathogenesis of atherosclerosis the possible pathomechanism remains unclear. The so-called "heat-shock proteins" are discussed as a possible link.

Heat-shock proteins are widely spread in nature and are usually produced in a large number by pro- and eukaryotic cells in case of stress situations (mechanical stress, high temperature, infections etc.). The decisive characteristic of the heat-shock proteins - and that is why they are discussed as being involved in the pathogenesis of atherosclerosis - is the great sequence-homology of heat-shock proteins in the organisms of human beings, plants, animals and bacteria. Because of that an autoimmune reaction is conceivable: A humoral or cellular immune reaction originally aimed at the pathogen is in the course of a cross reaction erroneously aimed at self epitopes. Especially the heat-shock protein 60 of *Chlamydia pneumoniae* is discussed as the trigger of such an autoimmune reaction. Its possible correlation with coronary artery disease was another main aspect of this study. It was analysed if coronary artery disease (proved by

coronary angiography) was significantly related to antibodies against chlamydial heat-shock protein 60.

To examine this all sera which had been tested positive in the MIF test were afterwards analysed by means of immunoblotting and by means of an enzyme immunoassay to find out if there was a reaction against purified, recombinant chlamydial heat-shock protein 60. Finally no correlation could be found:

In case of 29 % of the patients suffering from coronary artery disease and in case of 30 % of the healthy patients antibodies against chlamydial heat-shock protein 60 were found ($p = 0,751$).

Furthermore an analysis concerning the severity of coronary artery disease and antibodies against the heat-shock protein 60 of *C. pneumoniae* was done and no correlation was found. No correlation between an earlier myocardial infarction and antibodies against the HSP-60 of *C. pneumoniae* was found, either ($p = 0,458$), and moreover no correlation could be detected concerning the severity of coronary artery disease and the concentration of antibodies.

Altogether it seems that on the basis of the results of this study a correlation of the infection with *C. pneumoniae* and atherosclerosis is possible - because the significantly more frequent proof of antibodies against *C. pneumoniae* was found in patients suffering from coronary artery disease.

However it needs to be discussed to what extent the proof of antibodies is a real proof of a causal connection. A significant correlation between coronary artery disease and proven serological signs of an infection caused by *C. pneumoniae* does not prove an etiological connection that means does not allow to distinguish between *C. pneumoniae* as the cause or the epiphenomenon.

The lack of the association between the serological immune response against HSP-60 and coronary artery disease speaks out against a possible involvement of HSP-60 in the pathogenesis of atherosclerosis.

3. EINLEITUNG

3.1 Chlamydien – ein Überblick

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Erreger und werden zur Gruppe der gramnegativen Bakterien gezählt, obwohl ihre Zellwand im Gegensatz zu anderen gramnegativen Erregern kein Murein enthält [Kuo et al. 1995]. Insgesamt sind drei humanpathogene Arten bekannt: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae*. Allen drei Arten kommt eine große humanmedizinische Bedeutung zu, da sie ein sehr breites Erkrankungsspektrum - von Augeninfektionen über respiratorische bis hin zu urogenitalen Infektionen - hervorrufen können. Während bei *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* der Mensch der natürliche Wirt ist, stellen Vögel und niedere Säugetiere bei *C. psittaci* die Erregerreservoirare dar [Grayston et al. 1989].

Bei Betrachtung des chlamydialen Genoms findet sich eine DNA-Homologie zwischen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*, welche weniger als 5 % beträgt, und zwischen *C. pneumoniae* und *C. psittaci* eine Homologie von weniger als 10 %. Verschiedene Isolate einer Art hingegen, beispielsweise von *C. pneumoniae*, zeigen eine Homologie von 94 % bis 100 % [Kuo et al. 1995].

Gemeinsamkeit aller Chlamydienspezies ist jedoch ein charakteristischer Vermehrungszyklus (s. Abb. 3.1), der eine Dauer von 48 – 72 Stunden aufweist und bei dem zwischen zwei verschiedenen Differenzierungsformen der Bakterien unterschieden werden kann.

Elementarkörperchen weisen einen Durchmesser von ca. 0,1 – 0,2 µm auf, besitzen eine elektronendichte Zellwand, sind extrazellulär gelegen und stellen die infektiöse Form der Chlamydien dar. Sie besitzen keine Replikationsfähigkeit.

Nach Phagozytose der Elementarkörperchen durch eine Wirtszelle, und Entwicklung einer Intermediärform, liegen die Bakterien schließlich als Retikularkörperchen in der infizierten Wirtszelle vor. Diese Retikularkörperchen besitzen einen Durchmesser von ca. 1 - 2 µm und stellen die metabolisch aktive, vermehrungsfähige Form der Chlamydien dar. Über eine weitere Intermediärform entwickeln sich die Chlamydien nach erfolgter Vermehrung

wiederum zu Elementarkörperchen, die nach Lyse der befallenen Zelle erneut weitere Zellen infizieren können.

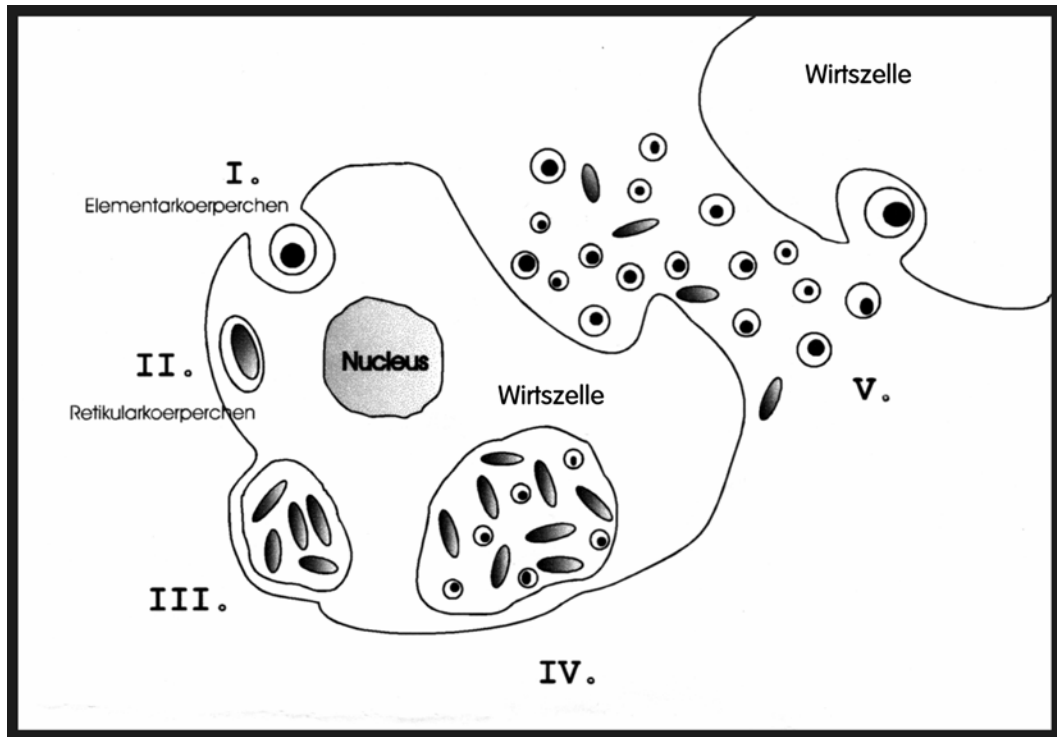


Abbildung 3.1:

Vermehrungszyklus von Chlamydien

(Gesamtdauer: 48-72 Stunden)

- I. Phagozytose eines Elementarkörperchens durch eine eukaryontische Wirtszelle
- II. Entwicklung eines Retikularkörperchens
- III. Vermehrung der Retikularkörperchen; Bildung eines Einschlusskörpers
- IV. Redifferenzierung der Retikularkörperchen zu Elementarkörperchen
- V. Freisetzung der Elementarkörperchen unter Lyse der Wirtszelle; Infektion weiterer Wirtszellen

Infektionen durch *C. trachomatis* werden durch die 18 verschiedenen Serovare A-L₃ verursacht und äußern sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern [Kuo et al. 1995].

Die Serovare A-C verursachen akute Konjunktividen, während es bei chronischen Infektionen zur Ausbildung des Trachoms kommt, einer chronischen Keratokonjunktivitis, die vor allem in tropischen und subtropischen Regionen mit mangelnder Hygiene zu finden ist. Ohne therapeutisches Eingreifen führt das Trachom zur Erblindung.

Die durch die Serovare D-K verursachten Erkrankungen sind genitale Infektionen, die sich akut in Urethritis, Zervizitis sowie chronisch in Epididymitis, Perihepatitis, extrauteriner Gravidität sowie tubarer Infertilität äußern. Allerdings handelt es sich in 50-70 % der Fälle, v.a. bei Frauen, um subklinische Infektionen. Diese durch die Typen D-K verursachten Infektionen sind die am häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen (ca. 89 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit), betreffen vor allem junge Frauen und Männer im Alter von 15 – 24 Jahren und stellen eine wesentliche Ursache für die Entwicklung von Infertilität dar [WHO 1995].

Die Serovare L₁-L₃ sind für das Krankheitsbild des Lymphogranuloma venereum verantwortlich, welches sich vor allem in warmen Ländern bei niedrigeren sozialen Bevölkerungsschichten manifestiert. Die Symptomatik ist durch eine an der Infektionsstelle entstehende herpetiforme Primärläsion, die sich zu einem Ulcus entwickelt, sowie durch eine sehr schmerzhaftes Lymphadenitis gekennzeichnet.

Infektionen durch *C. psittaci* werden zumeist über infizierte Vögel, die als Haustiere gehalten werden, übertragen. Infektionen von Mensch zu Mensch sind selten.

Das Krankheitsbild besteht in allgemeinen Erkältungszeichen wie Fieber und Kopfschmerzen, Myalgien und Arthralgien. Eine atypische Pneumonie findet sich in schweren Erkrankungsfällen.

3.2 *Chlamydia pneumoniae* – Charakteristika und Krankheitsbilder

C. pneumoniae wurde 1989 als dritte Spezies der Gattung Chlamydien etabliert, nachdem das Bakterium bis zu diesem Zeitpunkt mit dem Namen „TWAR“ bezeichnet worden war. Diese Bezeichnung ist auf die beiden ersten Isolate – zum einen von den Konjunktiven eines taiwanesischen Kindes („TW“) und zum anderen aus dem Respirationstrakt eines an Pharyngitis („AR“) erkrankten amerikanischen Studenten zurückzuführen [Grayston et al. 1989].

Hinsichtlich der Morphologie weist *C. pneumoniae* keine wesentlichen Unterschiede zu den anderen beiden humanpathogenen Arten auf – lediglich ein für *C. pneumoniae* typischer periplasmatischer Raum, der die Elementarkörperchen umgibt, ist beschrieben worden [Chi et al. 1987]. Es ist jedoch unklar, ob diesem morphologischen Unterschied eine Bedeutung zukommt [Kuo et al. 1995].

Die Seroprävalenz von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* beträgt unter der erwachsenen Bevölkerung weltweit über 50 %. Eine noch höhere Seroprävalenz findet sich bei erwachsenen Männern im Vergleich zu Frauen gleichen Alters sowie bei Menschen in weniger entwickelten Ländern im Vergleich zu Industrieländern. Die durch eine Infektion vor allem betroffenen Altersgruppen sind die der Schulkinder und Jugendlichen, wobei viele der Infektionen (90 %) einen asymptomatischen Verlauf zeigen. Die Übertragung einer *C. pneumoniae*-Infektion von Mensch zu Mensch kommt durch Aerosole zustande, die Inkubationszeit beträgt ca. 7 - 21 Tage. Die im Laufe einer Infektion gebildeten Antikörper hinterlassen keine bleibende Immunität, so dass Reinfektionen wahrscheinlich häufig sind [Kuo et al. 1995].

Am häufigsten manifestiert sich eine *C. pneumoniae*-Infektion als ein milder respiratorischer Infekt, der durch unspezifische Symptome wie Fieber, Husten, Halsschmerzen, Heiserkeit und Schluckbeschwerden gekennzeichnet ist. Weitaus seltener erkranken mit *C. pneumoniae* Infizierte an einer Bronchitis oder an einer atypischen Pneumonie. Allerdings ist *C. pneumoniae* für ca. 10 % der ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich [Grayston 1992]. Solche Pneumonien zeigen zumeist einen eher milden Verlauf, bringen jedoch oft eine mehrere Wochen dauernde Rekonvaleszenzzeit mit sich. Über Krankheitsfälle mit schweren systemischen Infektionen durch *C. pneumoniae* wurde in der

Vergangenheit berichtet, diese Manifestationen sind jedoch sehr selten [Kuo et al. 1995]. Weitere akute Erkrankungen, mit denen *C. pneumoniae* in Verbindung gebracht wird, sind: Sinusitis [Hashigucci et al. 1992], Otitis media [Ogawa et al. 1992], Endokarditis [Marrie et al. 1990] und lumbosakrale Meningoradikulitis [Michel et al. 1992]. Es finden sich weiterhin Hinweise, dass chronische Erkrankungen wie Asthma bronchiale [Hahn et al. 1991], Sarkoidose [Grönhagen-Riska et al. 1988], Erythema nodosum [Erntell et al. 1989], Guillain-Barré-Syndrom [Haidl et al. 1992] sowie reaktive Arthritis oder Morbus Reiter [Braun et al. 1994] in Zusammenhang mit *C. pneumoniae*-Infektionen stehen.

Innerhalb der letzten Jahre beherrscht jedoch ein völlig neuer Aspekt die wissenschaftliche Diskussion: Es ist die Frage, ob *Chlamydia pneumoniae* ursächlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist.

3.3 *Chlamydia pneumoniae* und Atherosklerose

Eine Verbindung zwischen der Atherosklerose und *C. pneumoniae* wurde erstmals in einer 1988 veröffentlichten Studie hergestellt, in der bei 50 % der Patienten, die an Koronarer Herzkrankheit litten, erhöhte Antikörper-Titer (IgG und IgA) gegen *C. pneumoniae* gefunden wurden [Saikku et al. 1988]. 68 % der Patienten mit akutem Myokardinfarkt wiesen im Serum erhöhte IgG- und IgA-Titer auf. Studien, die ebenfalls erhöhte Antikörper-Titer fanden, stützen die These einer bakteriellen Genese der Atherosklerose. Hierzu zählt unter anderem eine Studie, welche bei 41 % der untersuchten Patienten mit Koronarer Herzkrankheit Seren fanden, die eine positive Reaktion bezüglich chlamydialer Lipopolysaccharid-Immunkomplexe zeigten [Linnanmäki et al. 1993]. Weitere Bestätigung findet die These der infektiösen Genese der Atherosklerose durch Studien, die einen deutlichen Zusammenhang zwischen der angiographisch analysierten Ausprägung der Koronaren Herzkrankheit (d.h. Anzahl der koronaren Läsionen) und dem vorhandenen Antikörper-Titer (IgG) fanden [Thom et al. 1991]: Patienten mit Titern $\geq 1:64$ zeigten ein 2,8-fach erhöhtes Risiko an Koronarer Herzkrankheit zu leiden. Insgesamt wurden mittlerweile nahezu 40 Studien publiziert, die eine Assoziation zwischen *C. pneumoniae* und der Atherosklerose belegen.

Einen anderen Ansatz, einen Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und einer Infektion mit *C. pneumoniae* nachzuweisen, bieten Studien, die *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques nachwiesen [Kuo et al. 1993, Campbell et al. 1995]. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie der Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass in ca. 50 % der untersuchten Atherektomiepräparate *C. pneumoniae* vorhanden waren, wobei in diesen Studien kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein koronarer Läsionen und den analysierten Antikörper-Titern festzustellen war. Eine deutliche Assoziation zwischen bestehender Koronarer Herzkrankheit und Anwesenheit von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen beschrieb eine 1996 veröffentlichte Studie [Muhlestein et al. 1996]: Hier zeigte sich in 79 % der Fälle eine Präsenz von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen, während im Falle von nicht atherosklerotisch veränderten Präparaten lediglich eine Inzidenz von *C. pneumoniae* in Höhe von 4 % gefunden werden konnte. Eine diese Ergebnisse widerlegende Untersuchung stellt eine im gleichen Jahr durchgeführte dar [Weiss et al. 1996], da hier mit Ausnahme eines einzigen Patienten von insgesamt 58 weder mittels Kultur, noch PCR oder Elektronenmikroskopie ein Anhalt für *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen gefunden werden konnte. Zudem war die Prävalenz von IgG-Antikörpern bei den Patienten mit Koronarer Herzkrankheit deutlich geringer ausgeprägt wie im Falle der Kontroll-Patienten. Auch in einer weiteren Studie konnte lediglich bei 4 (8 %) von 50 untersuchten Atherektomiepräparaten von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit *C. pneumoniae* mittels PCR nachgewiesen werden [Jantos et al. 1999].

Insgesamt erschienen bisher ca. 50 Studien, die das Vorhandensein von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Läsionen untersucht haben – lediglich vier konnten *C. pneumoniae* nicht oder nur selten nachweisen [Übersicht bei Grayston 1999].

Es existieren verschiedene Erklärungsmodelle für die Anwesenheit von *C. pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques: Zum einen wird *C. pneumoniae* als Epiphänomen [Campbell et al. 1998] betrachtet, d.h., dass das Bakterium zwar in den Plaques persistiert, dass es jedoch keinen Beitrag zu Initiation oder Progression der Atherosklerose leistet. Zum anderen hält man die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion für „response to injury“ [Ross 1973], was

wiederum bedeutet, dass es durch Noxen, Mikroorganismen (beispielsweise *C. pneumoniae*) o.ä. zu einer endothelialen Dysfunktion kommt, wodurch inflammatorische und antiinflammatorische Substanzen freigesetzt werden, was letztlich zur Entwicklung einer entzündlich-atherosklerotischen Läsion führt.

Darüber hinaus beschäftigen sich Studien mit der Frage, inwieweit bereits bekannte Risikofaktoren, wie beispielsweise Rauchen oder ein erhöhtes Gesamtcholesterin gemeinsam mit einer *C. pneumoniae*-Infektion ein noch größeres Risiko für die Genese der Atherosklerose darstellen. Ein Zusammenhang zwischen erhöhten IgG-Titern gegen *C. pneumoniae* und erhöhtem Gesamt- / LDL-Cholesterin wurde nachgewiesen [Murray et al. 1999].

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass zur Genese atherosklerotischer Läsionen in Mäusen sowohl eine *C. pneumoniae*-Infektion als auch erhöhte Cholesterinspiegel notwendig sind - bei Vorliegen nur eines Faktors unterblieben Gefäßveränderungen [Hu et al. 1999]. Weitere Tiermodelle bestätigen diese Aussagen. So entwickelten Kaninchen, die mit *C. pneumoniae* intranasal inokuliert worden waren, atherosklerotische Läsionen, während nicht infizierte Kaninchen keine Läsionen entwickelten [Fong et al. 1997, Laitinen et al. 1997].

Wiederum andere Arbeiten versuchen, die infektiöse Genese so zu erklären, dass mikrobielle Antigene nach Expression auf der Wirtszelloberfläche physiologische Funktionen imitieren, d.h., dass sie beispielsweise die Adhäsion von Komplementfaktoren provozieren [Cines et al. 1982].

Ferner sei als möglicher Pathomechanismus das sog. „molekulare Mimikry“ erwähnt, in dessen Rahmen den Hitze-Schock-Proteinen (HSPs) besondere Bedeutung zukommt. Diese zeigen - vergleicht man humane und mikrobielle HSPs - eine große DNA-Sequenzhomologie [Young & Elliot 1989]. Somit wäre eine Autoimmunreaktion humoraler und zellulärer Abwehrfaktoren (T- und B-Lymphozyten), die ursprünglich gegen mikrobielles Antigen gerichtet waren, gegen körpereigene (z.B. vaskuläre) Epitope denkbar. Eine 1999 veröffentlichte Studie stützt diese These [Bachmaier et al. 1999], da hier die Sequenzhomologie zwischen einem cysteinreichen 60 kD-Membranprotein von *C. pneumoniae* (sowie *C. trachomatis* und *C. psittaci*) und einem Herzmuskelpeptid nachgewiesen wurde. Hierbei stellte man fest, dass T-Lymphozyten (CD-4), die durch das chlamydiale 60-kD-Protein - präsentiert über MHC-II-Moleküle - aktiviert wurden, eine lokale Immunreaktion, die gegen das körpereigene

Herzmuskelpeptid gerichtet war, hervorriefen. Diese erwies sich als perivaskulär inflammatorische Reaktion mit nachfolgenden fibrotischen Veränderungen sowie Entwicklung vaskulärer Stenosen. Gefolgt wurde diese Reaktion wiederum von einer systemischen Immunantwort mittels aktivierter T- und B-Lymphozyten. Im Tierversuch mit Mäusen entstanden schließlich schwere myokardiale Schäden. Somit wurden inflammatorische Reaktionen im Bereich des Myokards in den Formenkreis der Autoimmunkrankheiten gestellt, und damit wurde ein möglicher Pathomechanismus auch der Entstehung der Atherosklerose postuliert.

Falls die Atherosklerose - über welchen Pathomechanismus auch immer - tatsächlich bakteriell verursacht wird, so wäre eine Therapie mit Antibiotika (im Falle einer chlamydialen Infektion beispielsweise durch Tetrazykline oder Makrolide) eine mögliche therapeutische Option. Bisher sind zu diesem Aspekt sowohl prospektive als auch retrospektive Studien erschienen: Zwei retrospektive Studien kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen, da eine der beiden einen deutlichen Zusammenhang zwischen vorheriger Antibiotikatherapie (Makrolide, Sulfonamide, Penicilline oder Cephalosporine) und nachfolgender Entwicklung koronarer Ischämien zeigte [Meier et al. 1999], während die andere Studie das Gegenteil belegte [Jackson et al. 1999]. Es erschienen ferner, jedoch jeweils anhand eines kleinen Patientenkollektivs durchgeführte, prospektive Therapiestudien, von denen zwei [Gupta et al. 1997 und Gurfinkel et al. 1997] eine antibiotische Therapie befürworteten (neuerliche ischämische Ereignisse traten unter antibiotischer Therapie seltener auf), während die dritte [Anderson et al. 1999] dies aufgrund ihrer Forschungsergebnisse ablehnte: Azithromycin hatte keine Reduktion kardialer Ereignisse oder signifikanter Senkungen des zuvor bestimmten Antikörper-Titers gegen *C. pneumoniae* erbracht.

Weiterhin wird die Atherosklerose und ihre Pathogenese nicht nur mit einer Infektion durch *C. pneumoniae* in Verbindung gebracht, vielmehr existiert die Fragestellung, inwieweit *Helicobacter pylori*, das *Cytomegalievirus (CMV)* oder das *Herpes Simplex Virus (HSV)* ätiologisch in das Entstehen atherosklerotischer Plaques eingreifen [Chiu et al. 1997]. Diese Assoziation anderer bakterieller oder viraler Mikroorganismen mit der Atherosklerose wurde bereits 1973 und 1978 durch zwei Studien [Fabricant et al. 1978, Benditt et al. 1973] hergestellt: Sie konnten die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in Hühnern durch

deren Infektion mit einem Herpesvirus induzieren. Doch auch im Zusammenhang mit diesen weiteren Erregern existieren widersprüchliche Forschungsergebnisse, so zeigte beispielsweise eine neuere serologisch orientierte Studie keine deutliche Assoziation zwischen positivem Antikörper-Befund (IgG-Titer) gegen *Helicobacter pylori* und CMV (und auch *C. pneumoniae*) und dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit [Danesh et al. 1999].

Aufgrund aller dieser Untersuchungen läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine klare Aussage bezüglich eines kausalen Zusammenhanges zwischen *C. pneumoniae* und der Atherosklerose machen, jedoch scheint sich eine positive Assoziation abzuzeichnen.

3.4 Hitze – Schock – Proteine (HSPs)

Hitze-Schock-Proteine sind Proteine, die immer dann sowohl von pro- als auch von eukaryontischen Zellen vermehrt produziert werden, wenn diese Zellen Stress, wie beispielsweise Infektion, Hitze, mechanischer Irritation oder Ähnlichem ausgesetzt sind [Zügel et al. 1999]. Ansonsten liegen die Proteine in niedriger Konzentration im Zytosol und in den Mitochondrien vor. Ihnen kommen protektive und stabilisierende Funktionen zu, die in der Vermittlung der intrazellulären Faltung und Translokation von Proteinen liegen. Aufgrund dieser Aufgabe werden die Hitze-Schock-Proteine auch als molekulare Chaperone bezeichnet.

Kommt es zur Infektion einer Wirtszelle durch ein mikrobielles Pathogen, so werden Veränderungen der verschiedensten Parameter bewirkt, so beispielsweise von Temperatur, pH-Wert und pO_2 . Weiterhin entwickelt die Wirtszelle Abwehrmechanismen, wie z.B. die Phagozytose, wodurch das Pathogen mit O_2 -Radikalen, Nitrogen, lysosomalen Enzymen sowie Fe^{2+} konfrontiert wird. Zur eigenen Protektion reagiert der pathogene Mikroorganismus mit verschiedenen Evasionsmechanismen, wie beispielsweise der HSP-Produktion.

Allerdings beginnt nicht nur das infektiöse Agens mit der HSP-Produktion, sondern auch die Wirtszelle, da sie zum einen mit antimikrobiellen Mechanismen konfrontiert wird, die sie selbst induziert, und zum anderen

interagieren zahlreiche Erreger - vor allem intrazelluläre - mit dem Wirtszellmetabolismus.

Der Grund dafür, dass Hitze-Schock-Proteinen, deren Produktion durch mikrobielle Infektion ausgelöst wird, eine etwaige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten zugeschrieben wird, liegt letztlich - wie bereits oben mehrfach erwähnt - darin, dass eine große DNA-Sequenzhomologie zwischen humanen und bakteriellen Hitze-Schock-Proteinen besteht. Aufgrund dessen ist eine Kreuzreaktion im Sinne eines molekularen Mimikry denkbar, bei der die Immunreaktion, die ursprünglich gegen bakterielle Proteine gerichtet war, sich auch gegen die homologen Proteine des betroffenen Wirtsorganismus wendet.

Neben der bereits oben erwähnten Studie von Bachmaier et al. von 1999 existieren weitere Studien, die auf eine bedeutende Rolle der HSPs auch im Zusammenhang mit der Atherosklerose hindeuten. Bei Kaninchen mit Normcholesterinämie konnte durch Immunisation mit mykobakteriellem HSP-65 die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen induziert werden [Xu et al. 1992]. Darüber hinaus wurden 1993 bei Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen der Aa. carotides erhöhte Antikörper-Titer gegen mykobakterielles HSP-65 gefunden [Xu et al. 1993].

Auch im Falle einer Infektion mit *C. trachomatis* scheint solch ein Pathomechanismus möglich: So ist eine Assoziation zwischen einer Immunantwort gegen ein Hitze-Schock-Protein von *C. trachomatis*, dem HSP-60, und extrauteriner Gravidität, tubarer Infertilität sowie dem Trachom mehrmals beschrieben worden [Eckert et al. 1997, Peeling et al. 1998, Toye et al. 1993]. Eine hohe Expression von HSP-60 bei persistierenden Chlamydieninfektionen konnte ferner nachgewiesen werden [Beatty et al. 1994]. Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich die Frage, ob auch im Rahmen von Infektionen durch andere *Chlamydia spp.* Hitze-Schock-Proteine, insbesondere das HSP-60, eine pathogenetische Rolle spielen und somit auch ein Zusammenhang zwischen einer *C. pneumoniae*-Infektion und der Atherosklerose besteht. Hierzu sind bereits einige Studien erschienen: Endothelzellen, die einem Stress ausgesetzt wurden, der die HSP-60-Produktion induzierte, wurden durch eine Autoimmunreaktion zerstört [Xu et al. 1994, Schett et al. 1995]. 1999 beschreibt eine weitere Studie eine Endothelzerstörung durch Serumantikörper, die gegen Hitze-Schock-Proteine von *Escherichia coli* und *C. pneumoniae*

gerichtet waren. Ferner konnte mittels Immunhistochemie in 77 % der Fälle sowohl chlamydiales als auch humanes HSP-60 gemeinsam in Makrophagen, die in atherosklerotischen Läsionen lokalisiert waren, gefunden werden [Kol et al. 1998].

Somit existieren einige Studien, die solch eine Assoziation zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose - über das Verbindungsglied der Hitze-Schock-Proteine - möglich erscheinen lassen.

3.5 Ziel dieser Arbeit

Diese Studie verfolgte das Ziel, mit serologischen Methoden Zusammenhänge zwischen der Infektion mit dem Bakterium *Chlamydia pneumoniae* und der Atherosklerose zu untersuchen.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand hierbei, die mögliche Rolle der Hitze-Schock-Proteine näher zu analysieren, wobei die Aufdeckung eines kausalen Zusammenhanges nicht angestrebt wurde, vielmehr die Suche nach Hinweisen, die solch eine Kausalität möglich erscheinen lassen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob es eine Assoziation zwischen Serumantikörpern, die gegen chlamydiales HSP-60 gerichtet sind, und der Atherosklerose gibt.

4. MATERIALIEN

4.1 Zellen

4.1.1 Prokaryotische Zellen

4.1.1.1 *Chlamydia pneumoniae*; GiD

Herkunft: Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

4.1.1.2 *E. coli*

1. XL₁-blue, Plasmid: PQE 31 (Quiagen, Hilden, Deutschland).
2. XL₁-blue, Plasmid: PQE 31 und GroEl (Dr. rer. nat. F. N. Wuppermann, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, Institut für funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen) [Jantos et al. 2000].

4.1.2 Eukaryotische Zellen

4.1.2.1 HEp-2-Zelllinie

European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, England Nr.: 86030501.

4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1. Actidione (Cycloheximid).....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
2. Acrylamidlösung.....	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
3. ε-Aminocapronsäure.....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
4. Ammoniumpersulfat (APS).....	Merck, Darmstadt (Deutschland)
5. Ampicillin.....	Bayer, Leverkusen (Deutschland)
6. Bovines Serumalbumin (BSA).....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
7. Bromphenolblau.....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
8. Coomassie-Blau R-250.....	Serva, Heidelberg (Deutschland)
9. 3,3'-Diaminobenzidine.....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
10. DMSO (Dimethyl Sulfoxid).....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
11. Essigsäure (CH ₃ COOH).....	Merck, Darmstadt (Deutschland)
12. Ethanol (C ₂ H ₆ O).....	J.T. Baker, Deventer (Holland)

13. Ethylendiamintetraacetat (EDTA)..... Serva, Heidelberg (Deutschland)
14. Evans-Blau..... Behring, Marburg (Deutschland)
15. Glucose Monohydrat..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
16. Glutaminsäure..... Serva, Heidelberg (Deutschland)
17. Glycerin..... Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
18. Glycin..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
19. Isopropanol (C₃H₈O)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
20. Kaliumchlorid (KCl)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
21. Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
22. β-Mercaptoethanol..... Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
23. Methanol (CH₄O)..... J.T. Baker, Deventer (Holland)
24. Natriumacid (NaN₃)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
25. Natriumcarbonat (Na₂CO₃)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
26. Natriumchlorid (NaCl)..... Roth, Karlsruhe (Deutschland)
27. Natriumdodecylsulfat (SDS)..... Serva, Heidelberg (Deutschland)
28. Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
29. di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
30. Natronlauge (1M)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
31. OPD (o-phenyldiamindihydrochlorid)-Tabletten..... Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
32. Saccharose..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
33. Salzsäure (HCl)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
34. Schwefelsäure (H₂SO₄)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)
35. N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)..... Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
36. Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan..... Roth, Karlsruhe (Deutschland)
37. Tween 20..... Serva, Heidelberg (Deutschland)
38. Urografin 76 %..... Schering, Berlin (Deutschland)
39. Wasserstoffperoxid (H₂O₂)..... Merck, Darmstadt (Deutschland)

4.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
1. Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugierter Chlamydien-spezifischer monoklonaler Antikörper („Pathfinder“).....	Sanofi Pasteur, Freiburg (Deutschland)
2. Spezies-spezifischer, monoklonaler anti- <i>Chlamydia pneumoniae</i> Antikörper.....	DAKO, Hamburg (Deutschland)
3. Fluoreszein-Isothiocyanat konjugierter Kaninchen anti-Human IgG Antikörper.....	DAKO, Hamburg (Deutschland)

4. Fluoreszein-Isothiocyanat konjugierter
Kaninchen anti-Human IgM Antikörper..... DAKO, Hamburg (Deutschland)
5. Peroxidase-konjugierter Kaninchen
anti-Human IgG Antikörper..... DAKO, Hamburg (Deutschland)

4.4 Medien und Waschlösungen

4.4.1 Zell- und Chlamydienkulturmedium

Medium	Hersteller
1. Minimal Essential Medium (MEM), mit Earle's, Salzen mit HEPES, ohne L-Glutamin.....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)

4.4.2 Mediumzusätze, Waschlösung und Enzyme

Mediumzusatz, Waschlösung, Enzym	Hersteller
1. Cycloheximid (Actidione).....	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
2. Fötale Kälberserum (FKS).....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
3. Fungizone (Amphotericin B).....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
4. Gentamicin, Endkonzentration.....	Serva, Heidelberg (Deutschland)
5. L-Glutamin, Endkonzentration.....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
6. Nicht-essentielle Aminosäuren.....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
7. Vitamin-Lösung.....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
8. Hanks Salzlösung (HBSS).....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)
9. Trypsin / EDTA.....	Gibco BRL, Karlsruhe (Deutschland)

4.5 Kits

Kit	Hersteller
1. Chlamydien IgG rELISA.....	Medac, Hamburg (Deutschland)
2. Protein Assay.....	Pierce, Illinois (USA)
3. Elektrophorese Kalibrations Kit.....	Pharmacia, Freiburg (Deutschland)
4. Cellognost RF micro.....	Behring, Marburg (Deutschland)
5. Biotinylierter SDS-Standard-Marker.....	Bio-Rad, München (Deutschland)

4.6 Gebrauchsartikel

Gebrauchsartikel	Hersteller
1. Deckgläser (24 x 60 mm).....	Menzel, Braunschweig (Deutschland)
2. Objektträger (3 x 6 Felder).....	Bio Mérieux, Marcy l'Etoile (Frankreich)
3. Gewebekultur-Röhrchen: PS-Röhrchen 6 ml, steril.....	Greiner, Frickenhausen (Deutschland)
4. Glasplättchen (für Chlamydienkultur in Gewebekultur- Röhrchen) Deckgläser, Ø 12 mm.....	Menzel, Braunschweig (Deutschland)
5. Kulturflaschen: Polystyrene-Flaschen, 25 cm ² /50 ml und 80 cm ² /260 ml, steril.....	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)
6. Membran für Western-Blot: Immobilon-P Transfer Membran.....	Millipore, Eschborn (Deutschland)
7. Saugpapier für Western-Blot:.....	Schleicher & Schuell, (Deutschland)
8. Petrischalen (Ø 14 cm).....	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)
9. Sedimentationsröhrchen, 12 ml: PP-Röhrchen, steril.....	Greiner, Frickenhausen, (Deutschland)
10. Sedimentationsröhrchen, 50 ml: PP-Röhrchen, steril mit Schraubverschluss.....	Nerbe plus, Winsen (Deutschland)
11. Ultra-Clear-SE 12-Röhrchen.....	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)
12. Zellschaber 23 cm.....	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)
13. Mikrotiterplatten (maxisorp).....	Nunc, Wiesbaden (Deutschland)

4.7 Geräte

Gerät	Hersteller
1. Brutschrank: Steri-Cult 200.....	Forma-Scientific, Ohio (USA)
2. Microplate Autoreader (EL-310).....	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
3. Elektrophoresis Power Supply - EPS 600.....	Pharmacia, Freiburg (Deutschland)
4. Heizplatte & Rührer Ikamag RCT.....	Janke & Kunkel, Staufen i. Br. (Deutschland)
5. Schüttler KS 10.....	Bühler, Tübingen (Deutschland)
6. Schüttler VX-1.....	Janke & Kunkel, Staufen i. Br. (Deutschland)
7. Megafuge 1.0 R.....	Heraeus, Hanau (Deutschland)
8. Biofuge 13.....	Heraeus, Hanau (Deutschland)
9. Sorvall RC 2-B (Rotor SS-34 und SE-12).....	DuPont, Bad Homburg (Deutschland)
10. Sorvall RC3 (Rotor HG-4).....	DuPont, Bad Homburg (Deutschland)

5. METHODEN

5.1 Kultivierung von HEp-2 Zellen

5.1.1 Herstellung des Wachstumsmediums für HEp-2 Zellen

Die nachfolgenden Bestandteile werden dem oben genannten Medium zugesetzt:

- 500 ml Minimal Essential Medium (MEM) Eagle + HEPES (25 mM) + „Earle's Salze“ (ohne L-Glutamin),
- 50 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS) (Endkonzentration 10 %),
- 5 ml Amphotericin B (Endkonzentration 2,5 µg/ml),
- 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Endkonzentration 1 x),
- 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM),
- 5 ml Vitamine (Endkonzentration 1 x),
- 0,5 ml Gentamycin (Endkonzentration 10 µg/ml),
- 5 g Glucose (Endkonzentration 56 mM).

5.1.2 Herstellung der Stammlösungen für das Wachstumsmedium

5.1.2.1 Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums (FKS)

- Bei Raumtemperatur wird eine Flasche FKS so lange (ca. 90 min) aufgetaut, bis sich zwischen noch gefrorenem FKS und Flasche eine Flüssigkeitsschicht gebildet hat.
- Es folgt eine Erwärmung auf 20 °C für 25 min, an die sich eine Erwärmung auf 37 °C für 35 min anschließt.
- Die eigentliche Hitzeinaktivierung erfolgt bei 56 °C für 60 min unter gelegentlichem Drehen der Flasche FKS.
- Das FKS wird à 50 ml portioniert und wird bei -20 °C aufbewahrt.

5.1.2.2 Herstellung der Glucoselösung

- 100 g Glucosemonohydrat werden - unter Rühren und leichtem Erwärmen (bis max. 40 °C) - in destilliertem Wasser gelöst bis ein Endvolumen von 100 ml erreicht ist.
- Die Lösung wird autoklaviert - sollte dies nicht unmittelbar nach Herstellung möglich sein, wird sie über Nacht bei 4 °C gelagert.
- Die sterile Lösung wird à 5 ml portioniert und bei -20 °C aufbewahrt.

5.1.2.3 Herstellung der übrigen Bestandteile des Wachstumsmediums

Auch die übrigen Bestandteile, wie Vitamine, L-Glutamin, Aminosäuren, Antibiotika und Glucose werden portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

5.1.3 Herstellung der Gebrauchslösungen für die Zellkultur

5.1.3.1 0,5 x Trypsin / EDTA

- 10 x Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco) wird in Portionen à 5 ml aufgeteilt.
- Als Gebrauchslösung werden 5 ml der 10 x Trypsin/EDTA-Lösung und 95 ml Hanks-Lösung (HBSS) zusammenpipettiert.
- Die fertige Lösung wird bei 4 °C gelagert.

5.1.4 Auftauen von HEp-2 Zellen

- Die in einem Röhrchen eingefrorenen HEp-2 Zellen werden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut.
- Das Röhrchen wird gevortext.
- Die Zellsuspension wird in 20 ml Wachstumsmedium aufgenommen und gevortext.
- Die Suspension wird bei 43 x g für 10 min zentrifugiert.
- Nach Absaugen des Überstandes wird das Sediment in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert.
- Diese Suspension wird in eine Zellkulturflasche mit vorgelegter Menge Wachstumsmedium gegeben. Im Falle der 25 cm²-Flasche werden 3 ml, im Falle der 80 cm²-Flasche werden 25 ml vorgelegt.

5.1.5 Trypsinbehandlung von HEp-2 Zellen

- Das Wachstumsmedium wird von Zellen einer Kulturflasche (80 cm²), die einen konfluenten Zellrasen bilden, abgesaugt.
- Die Zellen werden zweimal mit je 10 ml Hanks-Lösung vorsichtig gewaschen.
- 5 ml Trypsin/EDTA (Gebrauchslösung) werden auf die Zellen aufgebracht und dann für maximal 5 min bei 37°C inkubiert. Dieser Arbeitsschritt dient der Ablösung der Zellen, was durch leichtes Schwenken der Zellkulturflasche unterstützt wird (Ablösung wird mikroskopisch kontrolliert).
- Es werden zum Abstoppen der Ablösungsreaktion der Zellsuspension 5 ml Wachstumsmedium hinzugefügt.
- Die Suspension wird in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert.
- Es folgt die Zentrifugation bei 43 x g für 10 min.
- Das entstandene Sediment wird in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert.

5.1.6 Passagieren von HEp-2 Zellen

5.1.6.1 Passage in Gewebekulturröhrchen (GKs)

- Die steril geöffneten GKs werden mit je einem sterilen Glasplättchen (ø 12 mm) beschickt.
- Es wird ein 12 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Wachstumsmedium vorbereitet.
- Die Zellsuspension (s. Kap. 5.1.5, Produkt des letzten Arbeitsschrittes) wird gevortext, und 1 ml dieser Suspension wird in die vorbereiteten 10 ml pipettiert.
- Diese Lösung wird gut gevortext.
- Dann wird in jedes der vorbereiteten GKs 1 ml dieser Suspension pipettiert.
- Es folgt die Inkubation der GKs für 2-3 Tage bei 37° C.

5.1.6.2 Passage in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²)

- Es werden Zellkulturflaschen mit je 8 ml Wachstumsmedium beschickt.
- Eine Zellsuspension wird gevortext, und es werden je 0,8 - 1 ml dieser Suspension in die Zellkulturflaschen pipettiert.
- Die Flaschen werden leicht geschwenkt.
- Es folgt die Inkubation der Zellkulturflaschen (die Deckel sollten leicht geöffnet sein) für 2-3 Tage (maximal 7 Tage) bei 37 °C, 6 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit.

5.1.6.3 Passage in großen Zellkulturflaschen (80 cm²)

- Es werden je 30 ml Wachstumsmedium in die Zellkulturflaschen vorgelegt.
- Im Wachstumsmedium resuspendierte Zellen werden gevortext und je 1-1,6 ml dieser Suspension in die vorbereiteten Zellkulturflaschen pipettiert.
- Zur Verteilung der Zellen werden die Flaschen leicht geschwenkt.
- Die Zellkulturflaschen werden mit leicht geöffnetem Deckel für 2-3 Tage bis zur nächsten Passage bei 37 °C, 6 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5.1.7 Einfrieren von HEp-2 Zellen

- Das Wachstumsmedium wird aus einer Zellkulturflasche (80 cm²) abgesaugt.
- Die Zellen werden zweimal mit je 10 ml HBSS-Lösung vorsichtig gewaschen.
- Es werden 5 ml Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung auf die Zellen aufgebracht. Zu deren Ablösung (mikroskopische Kontrolle) werden sie dann maximal 5 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.
- 5 ml Wachstumsmedium werden hinzugefügt, was die Ablösungsreaktion stoppt.
- Die Suspension wird in ein steriles 12 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert.
- Es erfolgt die Zentrifugation bei 43 x g für 10 min.
- Das Sediment wird in 1 ml Einfriermedium (90 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert.
- Die Suspension wird gevortext und anschließend in ein Einfrier Röhrchen gefüllt.

- Dieses Röhrchen wird in eine Isopropanol-Einfrierbox gegeben und bei -70 °C für 24-48 h eingefroren. Dieser Arbeitsschritt dient dem schonenden Einfrieren der Zellen.
- Dann werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2 Kultur von *Chlamydia pneumoniae*

5.2.1 Herstellung des Wachstumsmediums für Chlamydien

Das Wachstumsmedium entspricht dem für HEp-2 Zellen, allerdings muss zusätzlich noch Cycloheximid in einer Konzentration von 1,2 µg / ml zugefügt werden.

5.2.2 Herstellung der Stammlösungen für die Chlamydienkultur

5.2.2.1 Cycloheximid

- In 100 ml HBSS werden 10 mg Cycloheximid gelöst, anschließend steril filtriert und portioniert.
- Die Aufbewahrung erfolgt bis zum Gebrauch bei -20 °C.

5.2.2.2 Saccharose-Phosphat-Glutaminsäure-Puffer (SPG-Puffer)

- 75 g Saccharose,
0,52 g KH₂PO₄ (3 mM),
1,53 g Na₂HPO₄ (0,01 M),
0,72 g Glutaminsäure (4 mM)
werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Der pH-Wert wird auf 7,4 -7,6 eingestellt.
- Der fertige Puffer wird autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

5.2.2.3 Einfriermedium für Chlamydien

- SPG-Puffer wird mit 20 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum versetzt und in Mengen à 10 ml portioniert.
- Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

5.2.2.4 Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

- 8 g NaCl (0,14 M),
0,2 g KCl (3 mM),
1,44 g Na₂HPO₄ (0,01 M),
0,24 g KH₂PO₄ (2 mM)
werden eingewogen und in 800 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.
- Die Lösung wird auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

5.2.3 Auftauen von Chlamydien

- Aus dem flüssigen Stickstoff wird ein Einfrierröhrchen entnommen und möglichst schnell auf 37 °C erwärmt.
- Es werden 10 ml Wachstumsmedium in einem sterilen 12 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt.
- Die Chlamydien suspension wird in die 10 ml Wachstumsmedium überführt und gevortext.

In Abhängigkeit von der Infektionsdosis der Suspension werden GKs (bei niedriger Infektionsdosis) oder 1-2 kleine Zellkulturflaschen (bei höherer Infektionsdosis) infiziert.

5.2.4 Passage von Chlamydien in Gewebekulturröhrchen (GKs)

- Alle folgenden Arbeitsschritte, bei denen die GKs bzw. die Gefäße, die Medium enthalten, geöffnet werden, müssen unter sterilen Bedingungen erfolgen.
- Um 10 GKs, die HEp-2 Zellen enthalten, mit Chlamydien zu infizieren, wird eine zu passagierende Chlamydien suspension in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Die verwendete Menge der Chlamydien suspension richtet sich nach dem Infektionsgrad, welcher zuvor durch eine Immunfluoreszenzfärbung (s. Kap. 5.2.7.2) feststellbar ist.
- Je 1 ml der Chlamydien suspension wird in jedes GK pipettiert.

- Die GKs werden für 1 h bei 30 °C und 4000 x g zentrifugiert (Sorvall RC-3 Zentrifuge; Rotor HG-4).
- Dann folgt eine Adsorptionsphase für 60 min bei 37 °C.
- Anschließend wird ein Mediumwechsel durchgeführt und je 1 ml Chlamydien-Wachstumsmedium auf die infizierten Zellen aufgebracht.
- Es folgt eine Inkubation für 3-5 Tage bei 37 °C, an deren Ende anhand eines GKs eine Immunfluoreszenzfärbung (s. Kap. 5.2.7.2) zur Überprüfung der Infektion durchgeführt wird.
- In die übrigen GKs werden je 0,3 g autoklavierte Glasperlen (ø 0,5 mm) gefüllt, dann werden die GKs verschlossen und für 30 sec gevortext, um die Zellen zu zerstören und die Chlamydien freizusetzen.
- Die Flüssigkeit der GKs wird entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettiert und zentrifugiert (10 min bei 1560 x g).
- Der Überstand wird nun zur weiteren Passage der Chlamydien verwendet.

5.2.5 Passage von Chlamydien in Kulturfラスchen (25 cm²)

- Eine zu passagierende Chlamydien suspension wird mit Wachstumsmedium (für HEp-2 Zellen) auf ein Volumen von 8 ml je zu beschickender Zellkulturflasche (25 cm²) aufgefüllt.
- Von den mit einem konfluenten Zellrasen bewachsenen Zellkulturflaschen wird das Wachstumsmedium abgesaugt.
- Nun werden 8 ml Chlamydien suspension vorsichtig in jede Zellkulturflasche pipettiert.
- Es erfolgt die Zentrifugation der Flaschen bei 1340 x g für 60 min bei 30 °C.
- Die Chlamydien suspension wird abgezogen und stattdessen 8 ml Chlamydien-Wachstumsmedium auf die infizierten Zellen aufgebracht.
- Die Zellen werden bei 37 °C, 6 % CO₂ und 80 % Luftfeuchtigkeit für 3-5 Tage inkubiert.
- Nach diesen 3-5 Tagen werden die Zellkulturflaschen zunächst mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes (Vergrößerung: 100-200-fach) hinsichtlich ihrer Infektion beurteilt: Starke Ablösung der Zellen sowie das Auftreten von Einschlusskörperchen weisen auf eine starke Infektion hin, was eine

Verdünnung der Chlamydien suspension vor der nächsten Passage ermöglicht. Dementsprechend wird bei fehlenden Hinweisen auf eine starke Infektion keine Verdünnung vorgenommen. Eine noch genauere Beurteilung der Infektion ist mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung (s. Kap. 5.2.7.2) von parallel infizierten GKs möglich.

- Die Zellen werden unter Zuhilfenahme eines sterilen Zellschabers vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst.
- Der Inhalt der Flaschen wird entsprechend der gewünschten Verdünnung mit Wachstumsmedium versetzt oder bei Nichtgebrauch sedimentiert und eingefroren.
- Die verdünnte Chlamydien suspension wird 30 sec beschallt.
- Es folgt die Zentrifugation bei 1560 x g für 10 min.
- Der entstandene Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert.
- Der Überstand kann zur Infektion neuer HEp-2 Zellen verwendet werden.

5.2.6 Sedimentation und Einfrieren von Chlamydien

- Die nicht zur weiteren Infektion von HEp-2 Zellen verwendete Chlamydien suspension wird in Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und bei 30000 x g und 4 °C für 40 min (Sorvall RC2-B; Rotor SS-34) zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgezogen und verworfen.
- Es wird 1 ml SPG-Puffer oder zur längeren Lagerung Einfriermedium zu dem entstandenen Sediment hinzugefügt und dieses durch Vortexen und Beschallen resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein Einfriereröhrchen pipettiert und bei -70 °C aufbewahrt.

5.2.7 Chlamydien-Nachweis

5.2.7.1 Nachweis mittels Phasenkontrastmikroskopie

Bei 100-facher Gesamtvergrößerung werden die infizierten Zellkulturflaschen bzgl. Ablösungsrate der Zellen, Trübung und leichter Verfärbung des

Wachstumsmediums beurteilt. Weiterhin ist es möglich, Einschlusskörper zu erkennen. Sind diese Merkmale nachzuweisen, so spricht dies für eine gute Infektion der Zellen.

5.2.7.2 Nachweis mittels Immunofluoreszenz

5.2.7.2.1. Direkter immunologischer Nachweis

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (DAKO), der mit FITC konjugiert ist, werden Lipopolysaccharid-Komponenten nachgewiesen, die für *Chlamydia spp.* charakteristisch sind:

- Es wird ein mit Chlamydien infiziertes GK verwendet, wobei sich die infizierten Zellen auf einem Glasplättchen am Boden des GKs befinden.
- Das Wachstumsmedium wird abgesaugt und verworfen.
- Anschließend wird 1 ml Methanol zur Fixation hinzugegeben und für mindestens 10 min inkubiert.
- Das Methanol wird abgesaugt.
- Es folgt ein dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig aus dem GK entnommen und in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen gelegt.
- 20 µl Antikörper werden auf dem Glasplättchen gleichmäßig verteilt.
- Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer.
- In der Zwischenzeit wird ein Objektträger vorbereitet, indem ein Tropfen Glycerin/PBS (10/1) aufgebracht wird.
- Das Glasplättchen wird dreimal mit PBS gewaschen, wobei beim dritten Mal die 24-well-Platte mit dem Plättchen für 5 min auf einen Schüttler bei 100 U/min gestellt werden sollte.
- Dann wird das Glasplättchen entnommen, getrocknet und mit der Seite, auf der sich der Zellrasen befindet, vorsichtig auf den Tropfen Glycerin/PBS gelegt.
- Mittels des Fluoreszenzmikroskops lassen sich jetzt die Einschlusskörperchen der Chlamydien als apfelgrüne, rundliche Strukturen in den HEp-2 Zellen erkennen.
- Die Lagerung des Präparates erfolgt bei 4 °C im Dunkeln über mehrere Tage, da das Fluoreszenzsignal schnell nachlässt.

5.2.7.2.2. Indirekter immunologischer Nachweis

Unter Zuhilfenahme eines Maus-anti-*Chlamydia pneumoniae*-Antikörpers und eines mit FITC konjugierten F(ab')₂-Kaninchen-anti-Maus-Antikörpers erfolgt der spezifische Nachweis von *Chlamydia pneumoniae*.

- Es wird ein mit Chlamydien infiziertes GK verwendet, wobei sich die infizierten Zellen auf einem Glasplättchen am Boden des GKs befinden.
- Das Wachstumsmedium wird abgesaugt und verworfen.
- Anschließend wird 1 ml Methanol zur Fixation hinzugegeben und für mindestens 10 min inkubiert.
- Das Methanol wird abgesaugt.
- Es folgt ein dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS.
- Das Glasplättchen wird vorsichtig aus dem GK entnommen und in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen gelegt.
- Es werden 20 µl des Maus-anti-*Chlamydia pneumoniae*-Antikörpers, der zuvor 1:5 mit PBS verdünnt wurde, aufgebracht.
- Es folgt eine Inkubation bei 37 °C für 30 min in einer feuchten Kammer.
- Anschließend wird das Glasplättchen zweimal gewaschen, beim zweiten Mal auf dem Schüttler bei 100 U/min für 15 min.
- Der FITC-konjugierte F(ab')₂-Kaninchen-anti-Maus-Antikörper wird 1:10 mit PBS und 1 % Evans Blau verdünnt, und 20 µl werden auf das Glasplättchen gegeben.
- Nach einer Inkubation von 20 min bei 37 °C in der feuchten Kammer wird das Glasplättchen zweimal mit PBS gewaschen, bei beiden Waschgängen für 15 min auf dem Schüttler bei 100 U/min.
- Es wird ein Objektträger mit Glycerin/PBS vorbereitet und das getrocknete Glasplättchen aufgebracht.
- Mittels Fluoreszenzmikroskop lassen sich jetzt die Einschlusskörperchen der Chlamydien als apfelgrüne, rundliche Strukturen in den HEp-2 Zellen erkennen.
- Die Lagerung des Präparates erfolgt bei 4 °C im Dunkeln über mehrere Tage, da das Fluoreszenzsignal rasch nachlässt.

5.2.8 Reinigung einer Chlamydiensuspension über 30 % Urografin®

Da die Chlamydiensuspension auch nach erfolgter Differenzialzentrifugation noch Zellüberreste und andere Verunreinigungen enthält, ist vor einer weiteren Verwendung eine Reinigung über 30 % Urografin® durchzuführen.

- Es werden 3 ml 30 % Urografin® (76 % Urografin in Aqua dest. verdünnt) in ein Ultra-Clear-SE12-Röhrchen vorgelegt.
- 1-2 ml einer in PBS aufgenommenen Chlamydienprobe, die zur Vereinzelung der Elementarkörperchen im Ultra-Schall-Wasserbad beschallt wird, wird vorsichtig über das Urografin geschichtet.
- Es folgt eine Zentrifugation bei 15000 U/min für 30 min bei 4 °C (Sorvall RC2-B; SE12-Rotor).
- Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und dann verworfen, das Sediment in 7 ml PBS aufgenommen.
- Die Suspension wird dann erneut bei 15000 U/min für 30 min bei 4 °C (SE12-Rotor) zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und dann verworfen, das Sediment in 7 ml PBS aufgenommen.
- Die Suspension wird nochmals zentrifugiert, der Überstand in 1 ml PBS resuspendiert und diese Suspension kann zur Proteinbestimmung (s. Kap. 5.2.9) verwendet werden.

5.2.9 Proteinmengenabschätzung einer Chlamydiensuspension

Es wurde das BCA (= bicinchoninic acid) Protein Assay Reagent der Firma PIERCE, das eine BCA-Lösung (Reagenz A) und eine Cu-Sulfat-Lösung (Reagenz B) enthält, verwendet. Der Nachweis beruht darauf, dass Cu^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Proteinen zu Cu^+ reduziert werden und diese Cu^+ -Ionen dann mit je zwei BCA-Molekülen einen Chelatkomplex bilden. Durch diese Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch (bei 562 nm) in einem ELISA-Reader gemessen wird. Mittels Vergleiches mit einer Standardkurve wird der entsprechende Proteingehalt abgeschätzt.

- Es werden 100 µl einer Chlamydiensuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben.
- Die Suspension wird bei 13000 rpm (Heraeus Zentrifuge) für 30 min zentrifugiert.

- In der Zwischenzeit wird eine Protein-Standardverdünnungsreihe vorbereitet.
- Der nach Arbeitsschritt (2) entstandene Überstand wird verworfen, das Sediment wird in 1 ml PBS resuspendiert.
- Eine Verdünnungsreihe dieser Suspension wird (unter Verwendung von PBS) mit den Konzentrationen 1:2 und 1:10 angefertigt. Zudem wird die unverdünnte Suspension eingesetzt.
- Die Reaktionslösung wird aus je 50 Teilen des Reagenz A und einem Teil von Reagenz B angesetzt.
- Es werden in die zu belegenden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte 30 µl jeder Verdünnungsstufe pipettiert. Parallel wird zur Erstellung einer Eichkurve eine Protein-Standardverdünnungsreihe eingesetzt.
- Anschließend werden in jede belegte Vertiefung 200 µl der Reaktionslösung hinzugegeben.
- Als Leerwert werden 30 µl PBS, die mit 200 µl Reaktionslösung gemischt werden, verwendet.
- Es folgt eine Inkubationsphase von 30 min bei 37 °C.
- Dann erfolgt eine Bestimmung der optischen Dichten im Photometer bei 562 nm.
- Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe wird eine Eichkurve erstellt, die nun zum Abschätzen der Proteinmengen der Chlamydien suspension dient.

5.3 Chlamydien-IgG-ELISA

Hierbei handelt es sich um einen Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von spezifischen Immunglobulinen der Gruppe G (IgG), die gegen chlamydiales Lipopolysaccharid (rekombinant) in humanem Serum gerichtet sind (medac, Hamburg).

5.3.1 Durchführung

- Es werden jeweils 50 µl Patientenserum (1:100; aufgenommen in Verdünnungspuffer, der im Kit enthalten ist) sowie die Kontrollen (lyophilisiert; jede wird in Verdünnungspuffer aufgelöst) in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der im Kit

enthaltenen Mikrotiterstreifen pipettiert. Als Leerwert, für den ebenfalls zwei Vertiefungen benötigt werden, dienen jeweils 50 µl Verdünnungspuffer.

- Die Mikrotiterstreifen werden für 60 min bei 37 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.
- Die Streifen werden dreimal mit je 300 µl Waschpuffer (im Kit enthalten) pro Vertiefung gewaschen.
- Je 50 µl Konjugat (lyophilisiert; jedes wird zuvor in 3 ml Verdünnungspuffer aufgelöst) werden in jede Vertiefung gegeben.
- Dreimal werden die Streifen mit je 300 µl Waschpuffer (im Kit enthalten) pro Vertiefung gewaschen.
- 50 µl ABTS-Substratlösung (gebrauchsfertig, im Kit enthalten) werden in jede Vertiefung pipettiert.
- Es folgt eine Inkubationsphase von 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer.
- Es werden je 50 µl Stopplösung (gebrauchsfertig, im Kit enthalten) in alle Vertiefungen pipettiert. Eine positive Reaktion zeigt sich in einem Farbumschlag blau nach grün.
- Nun müssen die Mikrotiterstreifen in einem Photometer bei 405 nm gemessen werden.
- Die Titerbestimmung erfolgt nach der im Kit angegebenen Formel: $\text{Index} = \frac{\text{optische Dichte der Probe}}{\text{Cut-Off}}$. Der Cut-Off errechnet sich aus dem Mittelwert der optischen Dichten der negativen Kontrollen plus der dreifachen Standardabweichung. Bei Indexwerten $< 0,9$ liegt ein negatives Ergebnis vor.

5.4 Hitze-Schock-Protein (HSP) – Enzymimmunoassay

5.4.1 Reagenzien

5.4.1.1 Beschichtungs-Puffer

- 1,60 g Na_2CO_3 (0,015 M),
2,92 g NaHCO_3 (0,035 M),
0,20 g NaN_3 (0,003 M),
werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 9,6 - 9,9 liegen.

5.4.1.2 Waschpuffer

- 0,1 g Methiolat (0,01 %),
5 g BSA (0,5 %),
12 g Tris (0,02 M),
146 g NaCl (0,5 M),
2,5 ml Tween 20 (0,5 %)
werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 7,5 liegen.

5.4.1.3 Verdünnungspuffer

- 1 g BSA (0,1 %),
1,8 g EDTA (0,005 M),
2,42 g Tris (0,02 M),
8,85 g NaCl (0,15 M),
0,5 ml Tween 20 (0,05 %)
werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 7,5 liegen.

5.4.1.4 Blockierungspuffer

- 1,8 g EDTA (0,005 M),
2,42 g Tris (0,02 M),
8,85 g NaCl (0,15 M),
10 g BSA (1 %),
3 ml Tween 20 (0,3 %)
werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 7,5 liegen.

5.4.1.5 Citrat-Phosphat-Puffer

5.4.1.5.1 Stammlösung A und B

A: 0,1 M Zitronensäure ($C_6H_8O_7$) wird in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

B: 0,2 M Na_2HPO_4 wird in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

5.4.1.5.2 Gebrauchslösung

48,5 ml der Stammlösung A werden mit 51,5 ml der Stammlösung B versetzt (pH 5).

5.4.1.6 Substratlösung

Es wird eine Tablette OPD (o-phenyldiamindihydrochlorid) in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer gelöst.

5.4.2 Herstellung des gereinigten, rekombinanten HSP-60 von *C. pneumoniae*

Das HSP-60 wurde von Herrn Dr. rer. nat. F. N. Wuppermann hergestellt. Das *groEl*-Gen, welches das Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* enthält, wurde mittels PCR amplifiziert, im Expressions-Vektor pQE-31 (Quiagen) kloniert und in *E. coli* XL-1 blue (Stratagene) transformiert. Nach Kultivierung fand eine Reinigung über Ni-NT-Agarose statt. Mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting konnte das Protein identifiziert werden.

5.4.3 Durchführung

- Es wird gereinigtes, rekombinantes, chlamydiales HSP-60 in einer Konzentration von 2 µg / ml in den Beschichtungspuffer aufgenommen.
- Je 100 µl dieses Beschichtungspuffers werden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Nunc, maxisorp) pipettiert.
- Es folgt die Inkubation der Platte über Nacht bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
- Hiernach erfolgt ein dreimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung, wobei beim ersten Mal der Waschpuffer sofort wieder abgezogen wird und beim zweiten und dritten Mal die Platte für je 5-10 min auf dem Schüttler bei 150 U/min geschüttelt wird.
- 200 µl Blockierungspuffer werden in jede Vertiefung gegeben.
- Die Mikrotiterplatte wird bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80%) für 60 min inkubiert.
- Es erfolgt ein dreimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung, wobei beim ersten Mal der Waschpuffer sofort wieder abgezogen wird und beim zweiten und dritten Mal die Platte für je 5-10 min auf dem Schüttler bei 150 U/min geschüttelt wird.

- In die Vertiefungen werden die entsprechenden Patientenserum (1:100, in Verdünnungspuffer) aufgebracht. Als Leerwert dienen 100 µl Verdünnungspuffer, als Negativ-Kontrolle mindestens 10 bereits getestete Seren und als Positiv-Kontrolle ein sicher positives Serum.
- Die Mikrotiterplatte wird bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80%) für 60 min inkubiert.
- Erneut folgt ein dreimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung, wobei beim ersten Mal der Waschpuffer sofort wieder abgezogen wird und beim zweiten und dritten Mal die Platte für je 5-10 min auf den Schüttler bei 150 U/min geschüttelt wird.
- Jetzt wird der Sekundärantikörper (Anti-human IgG-Peroxidase) in einer Verdünnung von 1:6000 (im Verdünnungspuffer) aufgebracht und die Mikrotiterplatte erneut für 60 min inkubiert.
- Die Platte wird nochmals dreimal gewaschen.
- 100 µl Substrat werden in jede Vertiefung pipettiert.
- Die Mikrotiterplatte wird für 10 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.
- Die Reaktion wird mit 50 µl 4N H₂SO₄ abgestoppt.
- Nun wird mit Hilfe eines Photometers die Messung der optischen Dichte bei 492 nm gegen den Leerwert durchgeführt.
- Der Cut-Off-Wert wird durch den Mittelwert der Extinktionen bei 492 nm plus der dreifachen Standardabweichung der Extinktionen der 10 negativen Kontrollen festgelegt.

5.5 Mikroimmunfluoreszenztest (MIF)

Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Nachweisverfahren für Antikörper, die gegen *Chlamydia pneumoniae* gerichtet sind.

5.5.1 Antigen- und Antikörperpräparation, Verdünnung der Serumproben

5.5.1.1 Herstellung der Antigensuspension

- Von der Chlamydiensuspension einer gut infizierten kleinen Zellkulturflasche (25 cm²) werden je 100 µl in den Verdünnungsstufen 1:5,

1:10 und 1:20 (in PBS) sowie unverdünnt angesetzt und jeweils mit 0,25 % Dottersackflüssigkeit (eines bebrüteten Hühnereies) versetzt.

- Es werden je 10 µl jeder Verdünnung auf einem Objektträger für die Immunfluoreszenz aufgebracht.
- Nach dem Trocknen der Suspension (dies kann bei 50 °C auf der Heizplatte für maximal 5 min geschehen) folgt die Fixation des Antigens mit Methanol, die mindestens 10 min dauern sollte. Hierfür darf keine Küvette benutzt werden, da es sonst zum Ablösen des Antigens kommt.
- Es werden 20 µl des monoklonalen Antikörpers (s. Kap. 5.2.7.2) aufgebracht.
- Der Objektträger wird für 30 min bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80 %) inkubiert.
- Das Präparat wird dreimal mit PBS gewaschen, wobei bei den ersten beiden Malen das PBS sofort wieder abgezogen wird und beim dritten Mal die Küvette für 5 min auf einen Schüttler bei 100 U/min gestellt wird.
- Der Objektträger wird luftgetrocknet.
- Das Präparat wird mit Glycerin/PBS (10/1) und Deckglas versehen.
- Im Fluoreszenzmikroskop werden bei guter Infektion die Elementarkörperchen der Chlamydien als apfelgrüne Punkte erkennbar.
- Es wird die Verdünnungsstufe mit der besten Dichte ausgewählt und eine größere Menge der Antigensuspension angesetzt; hier wurden 5000 µl Chlamydien suspension mit 12,5 µl Dottersackflüssigkeit versetzt.
- Auf jedes Feld eines teflonbeschichteten Objektträgers für die Mikroimmunfluoreszenz werden je 3 µl dieser Antigensuspension pipettiert.
- Es folgt das Trocknen der Suspension und die Fixation des Antigens mit Methanol.
- Die Präparate können nun für 1-2 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

5.5.1.2 Herstellung der Antikörper-Lösung

- Es wird ein FITC-konjugierter Kaninchen-anti-human-Antikörper (DAKO) verwendet, der gegen IgG gerichtet ist. Wenn ein IgM-Nachweis erwünscht ist, wird ein gegen humanes IgM gerichteter Antikörper anstatt des IgG-Antikörpers verwendet.
- Der Antikörper wird mit Aqua dest. 1:50 verdünnt und 1 % Evans Blau zugesetzt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

5.5.1.3 Verdünnung der Serum-Proben

- Für den Mikroimmunfluoreszenztest werden die Patientenseren in den Verdünnungsstufen 1:16 bis 1:512 verwendet und nur in den Fällen, in denen bei einer Verdünnung von 1:512 noch ein positives Testergebnis vorliegt, werden noch weitere Verdünnungsstufen untersucht.
- Die verdünnten Seren können in Mikrotiterplatten (mit Deckeln versehen) bei -20 °C gelagert werden.

5.5.1.4 Durchführung des Mikroimmunfluoreszenztestes (MIF) für IgG

- Es werden 5 µl des Patientenserums, das auf *Chlamydia pneumoniae*-Antikörper getestet werden soll, in den Verdünnungsstufen 1:16 bis 1:512 auf einen zuvor mit Antigen präparierten Objektträger pipettiert. Das Serum sollte die gesamte Antigen-Fläche bedecken.
- Zur korrekten Beurteilung des MIF müssen immer Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt werden.
- Es folgt eine Inkubation für 60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer.
- Die Objektträger werden dreimal in einer Küvette auf dem Schüttler bei 150 U/min gewaschen, wobei die beiden ersten Waschvorgänge mit PBS, der letzte mit Aqua dest. durchgeführt wird.
- Die Objektträger werden luftgetrocknet.
- Anschließend werden je 5 µl der Antikörper-Lösung gleichmäßig auf jedem Objektträger-Feld verteilt.
- Die Objektträger werden für 60 min bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80 %) inkubiert.
- Die Präparate werden dreimal gewaschen und getrocknet.
- Die Objektträger werden mit Glycerin/PBS (10/1) und Deckgläsern versehen.
- Wenn kein sofortiges Ablesen der Ergebnisse beabsichtigt wird, können die Objektträger für maximal 24 h bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.

5.5.1.5 Durchführung des Mikroimmunfluoreszenztestes (MIF) für IgM

- Es werden 5 µl des Serums, das auf *Chlamydia pneumoniae*-Antikörper getestet werden soll, in den Verdünnungsstufen 1:16 bis 1:512 auf einen zuvor mit Antigen präparierten Objektträger pipettiert. Das Serum sollte die gesamte Antigen-Fläche bedecken.

- Zur korrekten Beurteilung des MIF müssen immer Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt werden.
- Es folgt eine Inkubation für 60 min bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit (80 %).
- Die Objektträger werden dreimal in einer Küvette auf dem Schüttler bei 150 U/min gewaschen, wobei die beiden ersten Waschvorgänge mit PBS, der letzte mit Aqua dest. durchgeführt wird.
- Die Objektträger werden luftgetrocknet.
- Anschließend werden je 5 µl der Antikörper-Lösung gleichmäßig auf jedem Objektträger-Feld verteilt.
- Die Objektträger werden für 60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert.
- Die Präparate werden dreimal gewaschen und getrocknet.
- Die Objektträger werden mit Glycerin/PBS (10/1) und Deckgläsern versehen.
- Wenn kein sofortiges Ablesen der Ergebnisse beabsichtigt wird, können die Objektträger für maximal 24 h bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.
- Die Seren mit einem positiven IgM-Testergebnis müssen - nach Rheumafaktor-Absorption - erneut getestet werden.
- Die Seren werden 1:6 in PBS verdünnt.
- 50 µl jedes verdünnten Serums wird mit 50 µl Absorbens (im Kit enthalten) versetzt.
- Dieser Ansatz wird für 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert.
- Der Überstand, den das jeweilige Serum jetzt in der Verdünnung 1:12 enthält, wird abgenommen und 1:2 weiter austitriert.
- Nun kann der MIF - wie oben beschrieben - erneut durchgeführt werden.

5.5.1.6 *Ergebniserfassung des MIF*

- Die Objektträger-Felder werden bei einer 40-fachen Objektivergrößerung im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Beurteilung der Testqualität müssen immer Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen zuerst bewertet werden.
- Der Antikörper-Titer eines Serums ist die höchste Verdünnungsstufe, in der noch eine deutliche Fluoreszenz der Elementarkörperchen zu beobachten ist.

Ist ein Serum bei einer Verdünnung von 1:512 noch positiv, muss es erneut in höheren Verdünnungsstufen getestet werden, um den Antikörper-Titer bestimmen zu können.

5.6 Immunoblotting

Immunoblotting ist eine Nachweismethode für Immunglobuline, die benutzt wird, um die Immunantwort gegen *C. pneumoniae*-Proteine näher zu analysieren. Im Gegensatz zum Mikroimmunfluoreszenztest ist jedoch nicht nur ein quantitativer, sondern auch ein qualitativer Nachweis möglich - nämlich der chlamydialen Proteine gegen die humanes IgG gerichtet ist. Diese chlamydialen Proteine werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und im sog. „Semidry-Electroblotting“ (Western Blot) auf eine Membran transferiert, auf der dann nach Inkubation mit humanem Serum und einem spezifischen Antikörper diese Proteine als Banden zu sehen sind.

5.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

5.6.1.1 Herstellung der Gebrauchslösungen

5.6.1.1.1. Kathodenpuffer (10 x)

- 1,52 g Tris (Endkonzentration 0,025 M),
2,62 g ϵ -ACAPS (Endkonzentration 0,04 M),
0,25 ml 20 % SDS (Endkonzentration 0,01 %)
werden in 50 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 9,4 liegen.

5.6.1.1.2. Anode-1-Puffer (10 x)

- 18,18 g Tris (Endkonzentration 0,3 M)
werden in 50 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert liegt bei 10,4.

5.6.1.1.3. Anode-2-Puffer (10 x)

- 1,52 g Tris (Endkonzentration 0,025 M)
werden in 50 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert soll bei 10,4 liegen.

5.6.1.1.4. *Lysis-Puffer (1 x)*

- 100 µl 20 % SDS (2 %),
50 µl β-Mercaptoethanol (5 %),
100 µl Glycerin (10 %),
1 µl 2 % Bromphenolblau (0,002 %),
125 µl Sammelgelpuffer (0,0625 M),
625 µl Aqua dest. werden zusammenpipettiert.
- Die Lösung wird bei 98 °C für 5 min erhitzt.
- Sie wird sofort auf Eis abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

5.6.1.2 *Herstellung der Antigen-Suspension*

- Ein Aliquot (300 µg Protein) einer gereinigten Chlamydiensuspension wird verwendet.
- Diese Suspension wird bei 15000 U/min für 30 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 110 µl Lysis-Puffer im Ultra-Schall-Wasserbad resuspendiert.
- Die Antigenprobe wird für 5 min bei 98 °C erhitzt.
- Die Probe wird anschließend auf Eis gelegt und kann bei -20 °C gelagert werden.

Eine Ausnahme bezüglich der Probenbehandlung stellt gereinigtes Hitze-Schock-Protein dar:

Dieses wird nicht sedimentiert, sondern 100 µl der Suspension (= 30 µg GroEl) werden in 100 µl 2-fach-Lysis-Puffer aufgenommen. Die anschließende Behandlung erfolgt wie in Arbeitsschritt (4) und (5) beschrieben.

5.6.1.3 *Herstellung der Standard-Molekulargewicht-Marker*

5.6.1.3.1. *Herstellung des Low-Molecular-Weight (LMW)-Markers (Pharmacia)*

- Der LMW-Marker wird mit 1000 µl Lysis-Puffer (s. Kap. 5.6.1.1.4.) versetzt.
- Die Lösung wird für 7 min bei 100 °C erhitzt.
- Der Marker wird auf Eis abgekühlt und kann bei -20 °C gelagert werden.
- Auf ein Proteingel (7 x 9 cm) werden pro Ladungstasche 5 µl aufgetragen.

5.6.1.3.2. *Herstellung des biotinylierten SDS-Standard-Markers (Bio-Rad)*

Dieser biotinylierte Marker wird verwendet, um Standard-Protein-Größen auf Immunoblotstreifen sichtbar zu machen. Dies wird durch folgende Reaktion möglich: Der Avidin-Peroxidase-Antikörper (wird dem Sekundärantikörper zugesetzt) erkennt Biotin und durch die Immunoblot-Entwicklung werden die Markerbanden sichtbar.

- Es werden 30 µl Lysis-Puffer und 10 µl des biotinylierten Markers zusammenpipettiert.
- Diese Lösung wird für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt.
- Der Marker kann sofort verwendet oder bei -20 °C eingefroren werden.

5.6.1.4 *Herstellung eines SDS-Trenngels*

Die Funktion eines Trenngels besteht darin, Proteine zu trennen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine vor allem durch deren Größe bestimmt wird, da durch den Zusatz des Sodiumdodecylsulfats (SDS) eine ähnliche Ladung der Polypeptidketten erreicht wird, somit steht das jeweilige Molekulargewicht als Differenzierungsfaktor im Vordergrund.

Zur Trennung chlamydialer Proteine wird ein 12 %-iges SDS-Gel verwendet.

(Die Mengenangaben genügen für zwei Gele mit einer Größe von ca. 7 x 9 cm.)

- Die Gelkammer wird zusammengebaut und auf einer Höhe von 1,8 cm unterhalb der Oberkante der kleineren von zwei verwendeten Glasscheiben die spätere Höhe des Trenngels markiert.
- 3,4 ml Aqua dest.,
2,5 ml Trenngelpuffer,
4 ml Acrylamidlösung
werden zusammenpipettiert.
- Diese Lösung wird für 1-2 min entgast.
- 50 µl SDS (20 %) werden hinzugegeben.
- 50 µl 10 % APS und 10 µl TEMED werden hinzupipettiert, gemischt und die Lösung in einer Spritze (10 ml) aufgezogen und verwendet.
- Es werden 250 µl Isopropanol zum Glätten der Oberfläche der Gele aufpipettiert.

- Das Gel muss mindestens für 1 h ruhen, bevor das Sammelgel gegossen wird, da sonst der Polymerisationsvorgang noch nicht abgeschlossen ist.
- Eine Lagerung des Trenngels für einige Tage ist in feuchtem Milieu bei 4 °C möglich.

5.6.1.5 Herstellung eines SDS-Sammelgels

Die Funktion dieses Gels liegt in der Komprimierung der aufgetragenen Proteine, so dass diese vor Eintritt in das Trenngel die gleiche Starthöhe erreichen.

(Die Mengenangaben sind für sechs Sammelgele ausreichend.)

- Das Isopropanol, das sich noch auf der Oberfläche des Trenngels befindet, wird abgezogen und die Oberfläche wird einmal mit Aqua dest. gespült.
- 6 ml Aqua dest.,
2,5 ml Sammelgelpuffer,
1,3 ml Acrylamidlösung
werden zusammenpipettiert.
- Die Lösung wird für 1-2 min entgast.
- Es werden 60 µl SDS (20 %) sowie 50 µl APS (10 %) und 10 µl TEMED hinzugegeben.
- Die Lösung wird bis zur Oberkante der kleineren Glasscheibe eingefüllt und sofort ein Gelkamm mit der gewünschten Zahl an Ladungstaschen eingesetzt. Sind keine getrennten Ladungstaschen erwünscht, so ist das Sammelgel bis auf eine Höhe von 7 mm unterhalb der Glasscheiben-Oberkante einzufüllen und mit Isopropanol zu überschichten.
- Das Gel muss für 1-2 h ruhen bevor der Gelkamm bzw. das Isopropanol vorsichtig entfernt wird.
- Eine Lagerung wird in feuchtem Milieu bei 4 °C durchgeführt.

5.6.1.6 Elektrophorese

- Die Elektrophoresekammer wird mit 250 ml Elektrodenpuffer angefüllt.
- Die Gele werden eingehängt (es müssen immer Vorrichtungen für zwei Gele eingebaut werden) und der Zwischenraum zwischen beiden Gelen wird mit ungefähr 50 ml Elektrodenpuffer aufgefüllt. Der Flüssigkeitsspiegel sollte mit der Oberkante der größeren Glasplatte abschließen. Vor dem Einfüllen

des Elektrodenpuffers zwischen beide Gelkammern muss die Dichtheit dieser zusammengebauten Apparatur mit Aqua dest. geprüft werden.

- Nun können die Proben aufgetragen werden. Es sollten, um scharfe Banden zu erreichen, Mengen von 5-10 µl aufgetragen werden. Im Falle eines Sammelgels ohne Ladungstaschen werden für das gesamte Gel 100 µl Proteinprobe (300 µg Protein) geladen.
- Die Elektrophoresekammer wird an ein Netzgerät angeschlossen und als Stromstärke werden für ein Gel 14 mA und für zwei Gele 26 mA gewählt. Der Elektrophoresevorgang dauert ungefähr 1 h 15 min-1 h 45 min; der genaue Zeitpunkt wird durch den Austritt der Lauffront an der Gelunterseite bestimmt.
- Die Gele, die nun die aufgetrennten Chlamydien-Proteine enthalten, werden anschließend sofort geblottet oder gefärbt.

5.6.2 Färbung eines SDS-Gels mit Coomassie-Blau

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, das zur unspezifischen Färbung von Proteinen dient.

5.6.2.1 Herstellung der Lösungen für die Coomassie-Färbung

5.6.2.1.1. Coomassie-Blau-Lösung

- 1 g Coomassie-Blau (0,1 %) wird in 450 ml Aqua dest. gelöst.
- 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (konz.) werden zugegeben.
- Die Lösung wird filtriert.

5.6.2.1.2. Entfärber

- 400 ml Methanol, 500 ml Aqua dest., 100 ml Essigsäure (konz.) werden zusammenpipettiert.
- Der Entfärber kann nach Gebrauch noch mehrmals verwendet werden. Hierzu wird er durch einen Kohlefilter wieder von den Farbbestandteilen befreit.

5.6.2.1.3. Fixierer

- 100 ml Essigsäure (konz.) werden mit 900 ml Aqua dest. versetzt.

5.6.2.2 Durchführung der Färbung

- Das SDS-Gel wird nach der Elektrophorese vorsichtig aus der Gelkammer entnommen und das Sammelgel entfernt.
- Dann wird es für 60 min auf dem Schüttler bei 30 U/min in der Coomassie-Blau-Lösung gefärbt.
- Das Gel wird entnommen und für 1-3 h in Entfärberlösung inkubiert. Die genaue Dauer dieses Vorgangs ist von Fall zu Fall anhand der gewünschten Bandendeutlichkeit festzulegen.
- Das Gel wird über Nacht in Fixiererlösung inkubiert.
- Bevor es getrocknet wird, legt man das Gel über Nacht in Aqua dest. + Glycerin (5 %).
- Das Gel wird in einem Gelrockner für ca. 3-4 h bei 85 °C getrocknet.

5.6.3 Semidry-Electroblotting

Semidry-Electroblotting dient dem Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran im elektrischen Feld.

5.6.3.1 Reagenzien

(Lagerung bei Raumtemperatur)

5.6.3.1.1. Blot-Waschpuffer (10 x)

- 12 g Tris (Endkonzentration 0,02 M),
146 g NaCl (Endkonzentration 0,5 M),
2,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %)
werden in 500 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt.

5.6.3.1.2. Blot-Verdünnungspuffer (1 x)

- 2,42 g Tris (Endkonzentration 0,02 M),
8,85 g NaCl (Endkonzentration 0,15 M),
1,8 g EDTA (Endkonzentration 5 mM),
1 g BSA (Endkonzentration 0,1 %),
0,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %)
werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt.

5.6.3.1.3. *Blot-Blockierungspuffer (10 x)*

- 12 g Tris (Endkonzentration 0,02 M),
44,2 g NaCl (Endkonzentration 0,15 M),
9 g EDTA (Endkonzentration 5 mM),
50 g BSA (Endkonzentration 1 %),
15 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,3 %)
werden in 500 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt.

5.6.3.2 *Durchführung des Blotvorganges*

- In großen Petrischalen (Ø 14 cm) werden pro Gel 10 ml des Anode-1-, Anode-2- und Kathoden-Puffers angesetzt. Hierzu wird je 1 ml Puffer mit 9 ml Methanol (20 %) versetzt und der Ansatz durch Schwenken gut gemischt.
- Pro Gel werden
 - 6 Filterpapiere in den Anode-1-Puffer,
 - 3 Filterpapiere in den Anode-2-Puffer,
 - 3 Filterpapiere in den Kathodenpuffergelegt, so dass sie völlig von Flüssigkeit durchtränkt werden.
Die verwendeten Filterpapiere sollten 7 x 9 cm groß sein.
- Die Blotfolie wird ebenfalls auf ein Maß von 7 x 9 cm zugeschnitten, in Methanol (60 %) benetzt und dann in eine gesonderte Petrischale mit Anode-2-Puffer gelegt.
- Jetzt kann die Blotapparatur zusammengebaut werden (sehr wichtig ist das Auswalzen von Luftblasen nach Zufügen eines Stapelbestandteiles, da sonst der Transfer unvollständig stattfindet).
Auf die untere Graphitplatte (= Anode) werden Filterpapiere, Blotfolie und SDS-Gel in folgender Reihenfolge gestapelt:
 - Filterpapiere aus Anode-1-Puffer,
 - 3 Filterpapiere aus Anode-2-Puffer,
 - Blotfolie,
- SDS-Gel (die Gelränder müssen mit Kugelschreiber auf der Blotfolie angezeichnet werden),
 - 3 Filterpapiere aus Kathodenpuffer.
- Die obere Graphitplatte (=Kathode) wird aufgelegt.

- Die Kammer wird an ein Netzgerät angeschlossen und bei einem Gel wird als Stromstärke 75 mA, bei zwei Gelen eine Stromstärke von 155 mA gewählt, jeweils für eine Dauer von 1 h 15 min bei einer Spannung von ungefähr 5 V.
- Um den Transfer zu unterstützen, wird die obere Graphitplatte zusätzlich mit ca. 1 kg beschwert.
- Nach dem Blotvorgang wird die Blotfolie für 10 min auf dem Schüttler bei 150 U/min in 30 ml Waschpuffer gewaschen.
- Die Filterpapiere werden verworfen, das SDS-Gel wird zur Kontrolle mit Coomassie-Blau (s. Kap 5.6.2) gefärbt.
- Die Blotfolie wird für mindestens 1 h (besser über Nacht) mit Blockierungspuffer auf einem Schüttler bei 30 U/min inkubiert.
- Die Folie wird nochmals gewaschen.
- Jetzt kann die Blotfolie sofort für Immunoblots genutzt oder aber eingefroren werden. Zum Einfrieren wird die Blotfolie zwischen zwei Filterpapieren auf der Heizplatte bei maximal 50 °C getrocknet, dann mit den Filterpapieren in Alufolie eingeschlagen und bei -20 °C aufbewahrt.

5.6.4 Immunoblot-Entwicklung

5.6.4.1 Reagenzien

5.6.4.1.1. Blot-Waschpuffer (10 x)

- 12 g Tris (Endkonzentration 0,02 M),
146 g NaCl (Endkonzentration 0,5 M),
2,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %)
werden in 500 ml Aqua dest. gelöst.
- Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt.

5.6.4.1.2. Blot-Verdünnungspuffer (1 x)

- 2,42 g Tris (Endkonzentration 0,02 M),
8,85 g NaCl (Endkonzentration 0,15 M),
1,8 g EDTA (Endkonzentration 5 mM),
1 g BSA (Endkonzentration 0,1 %),

0,5 ml Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %)

werden in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

- Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt.

5.6.4.1.3. Diaminobenzidin-Entwicklerlösung

- Es wird 1 Tablette der 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) in 4 ml Tris-HCl (50 mM) gelöst. (Diese DAB-Lösung kann ohne Wirkungsverlust bei -20 °C aufbewahrt werden.)
- 1 ml DAB-Lösung,
9 ml Tris-HCl (50 mM),
10 µl H₂O₂
werden zusammenpipettiert und gevortext.

5.6.4.2 Durchführung

- Zunächst werden die zu testenden Seren 1:100 im Verdünnungspuffer verdünnt.
- Je 1 ml Serum wird in die Vertiefung einer Blot-Entwicklungsplatte vorgelegt.
- Die Blotfolie wird mit Skalpell und Lineal in Streifen von 3 mm Breite geschnitten.
- Folgender Arbeitsschritt gilt nur für zuvor eingefrorene Blotfolie: Sie wird in 60 % Methanol getaucht und dann für 10 min auf dem Schüttler bei 150 U/min in Waschpuffer (Menge richtet sich nach Anzahl der Blotstreifen - für eine komplette Folie werden 30 ml verwendet) gewaschen.
- In jedes Serum wird ein Blotstreifen gelegt und dieser über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es folgt ein Waschvorgang, der aus drei Schritten besteht: Zunächst wird das Serum abgezogen und verworfen. Dann werden 2 ml des Blot-Waschpuffers auf jeden Blotstreifen gegeben, die Platte kurz geschwenkt und der Puffer sogleich wieder abgezogen. Die beiden letzten Waschgänge bestehen darin, je 2 ml Waschpuffer zu jedem Streifen hinzuzufügen und die Platte für 5-10 min auf den Schüttler bei 150 U/min zu stellen und abschließend den Waschpuffer wieder abzusaugen. Das Serum kann mit HEp-2 Zellen vorabsorbiert werden, um störende Hintergrundbanden zu unterdrücken.

- Der zweite Antikörper wird auf jeden Blotstreifen aufgebracht. Hierzu wird 1 ml eines Peroxidase-konjugierten-Kaninchen-anti-human-Antikörpers (DAKO), der gegen IgG gerichtet ist, in der Verdünnung 1:1000 (im Verdünnungspuffer) verwendet.
- Falls ein biotinylierter SDS-Standard-Marker verwendet wurde, muss der Avidin-Peroxidase-Antikörper (Bio-Rad) in der Verdünnung 1:3000 zugesetzt werden (s. Kap. 5.6.1.3.2.).
- Es folgt die Inkubation der Blotstreifen über Nacht in einer feuchten Kammer.
- Waschen der Blotstreifen: Zunächst wird das Serum abgezogen und verworfen. Dann werden 2 ml des Blot-Waschpuffers auf jeden Blotstreifen gegeben, die Platte kurz geschwenkt und der Puffer sogleich wieder abgezogen. Die beiden letzten Waschgänge bestehen darin, je 2 ml Waschpuffer zu jedem Streifen hinzuzufügen und die Platte für 5-10 min auf den Schüttler bei 150 U/min zu stellen und abschließend den Waschpuffer wieder abzuziehen.
- Die Diaminobenzidin-Entwicklerlösung (s. Kap. 5.6.4.1.3.) ist anzusetzen.
- 1 ml der Entwicklerlösung wird pro Blotstreifen aufgebracht. Die Entwicklungsreaktion wird nach ca. 5-15 min mit H₂O abgestoppt.
- Die Blotstreifen werden zwischen Filterpapiere gelegt und auf der Heizplatte bei 50 °C für maximal 5 min getrocknet.

5.6.5 Immunoblot-Auswertung

1. Zunächst wird mit Hilfe des biotinylierten Markers eine Eichkurve erstellt, da für ihn sowohl Laufstrecke der Banden als auch zugehörige Molekulargewichte bekannt sind.
2. Auf halblogarithmischem Papier wird auf der x-Achse die Laufstrecke der Proteinbanden aufgetragen. Die y-Achse wird zum Auftragen der Protein-Molekulargewichte in kDa verwendet.
3. Die Laufstrecke wird ausgehend von der Markierung des oberen Gelrandes bis zur entsprechenden Proteinbande mit Hilfe eines Lineals gemessen und gegen die bekannten Protein-Molekulargewichte aufgetragen.
4. Anhand der Kurve und der gemessenen Laufstrecken der Proteine des erstellten Immunoblots können die entsprechenden Proteingewichte bestimmt werden.

5.7 Berechnung des Gensini-Scores

Bei dem sog. Gensini-Score handelt es sich um einen Maßstab, mit Hilfe dessen eine Schweregradeinteilung der Koronaren Herzkrankheit erfolgen kann. Hierbei wird je nach angiographisch darstellbarer Stenose ein Wert zwischen 1 und 32 angenommen, der dann nochmals mit einem Faktor multipliziert wird. Dieser Faktor resultiert aus der Lokalisation der Stenosen, wobei je nach funktioneller Bedeutsamkeit der Wert entsprechend gewählt wird. So wird beispielsweise im Falle einer im Bereich des Hauptstammes lokalisierten Stenose (Linke Koronararterie, Segment 5) der Faktor 5 angenommen, während im Bereich der RCX mit dem Faktor 1 multipliziert wird. Somit wird eine Stenose von 75 %, welche im Bereich der linken Koronararterie (Segment 7) entstanden ist, mit dem Faktor 2,5 multipliziert, so dass ein Gensini-Score von $8 \times 2,5 = 20$ entsteht.

5.8 Statistische Auswertung

Nach der Datenerhebung und vor der Auswertung wurden die Patientendaten anonymisiert.

Das Vorhandensein humaner Serumantikörper gegen *C. pneumoniae*, gegen rekombinantes Hitze-Schock-Protein 60 und gegen andere chlamydiale Proteine wurde anhand des χ^2 -Testes und der Multiplen Regressions Analyse nach erfolgtem Abgleich hinsichtlich Alter und anderen Risikofaktoren der Patienten durchgeführt. Ein möglicher Zusammenhang sowohl zwischen dem positiven Antikörper-Befund und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit als auch zwischen dem Vorhandensein einer Koronaren Herzkrankheit und dem entsprechenden Antikörper-Titer sind anhand des nicht-parametrischen Gruppenvergleiches nach Kruskal-Wallis und zusätzlich mittels Multipler Regressions Analyse - nach Abgleich bzgl. koronarer Risikofaktoren - untersucht worden. Eine zweiseitige asymptotische Signifikanz mit einem Wert $< 0,05$ wurde als statistische Signifikanz bewertet.

Die statistischen Analysen wurden mittels des SPSS-Programmes für Windows-Software (Version 8.0) durchgeführt.

5.9 Serologische Stufendiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Koronare Herzkrankheit

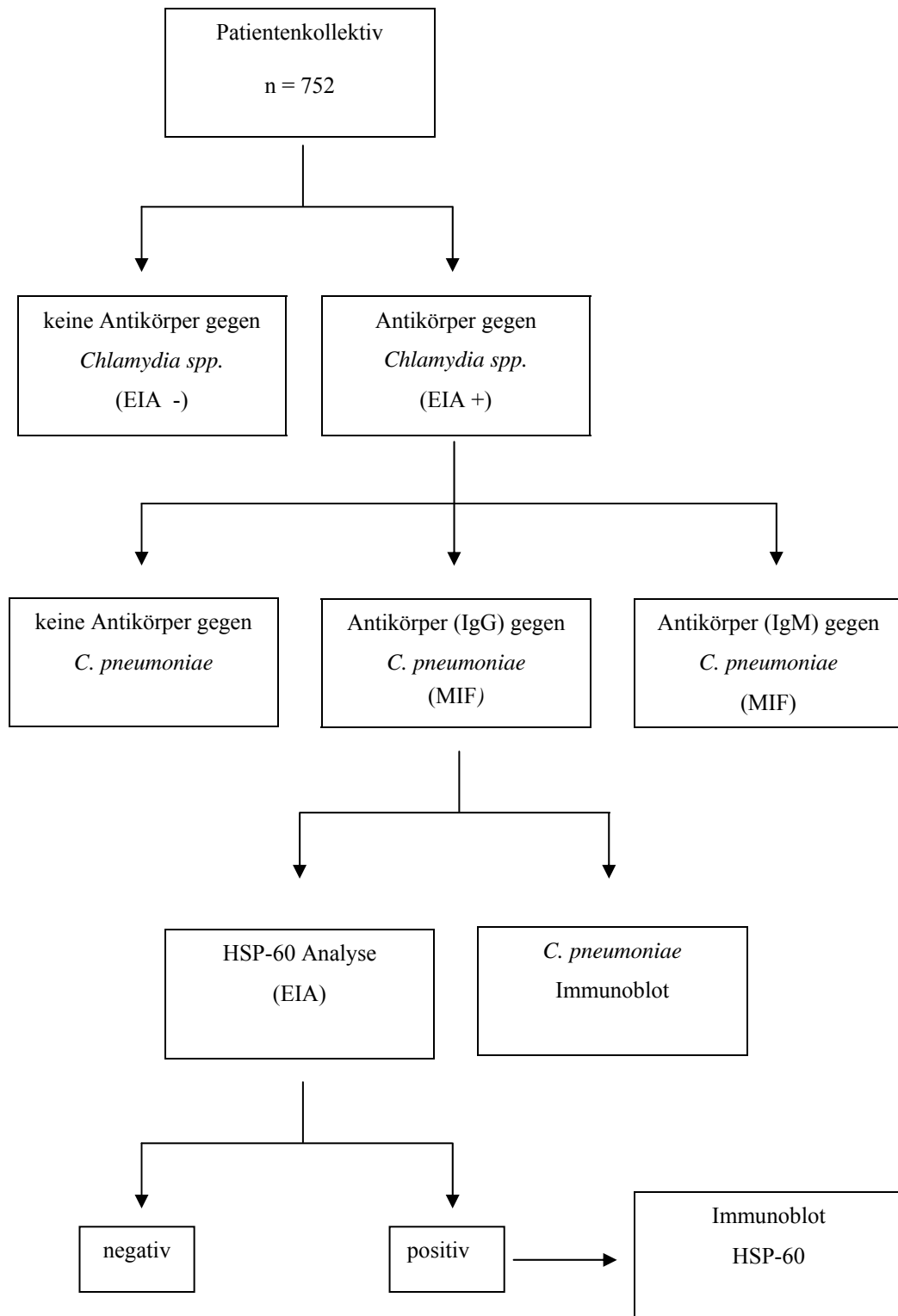


Abbildung 5.1: Schema der serologischen Stufendiagnostik

Ein Patientenkollektiv mit einer Gesamtanzahl von 752 Patienten, bei denen der koronare Status mittels einer Koronarangiographie bestimmt worden war, wurde zunächst mittels eines Enzymimmunoassays (EIA, als Antigen diente chlamydiales Lipopolysaccharid) auf das Vorliegen von Antikörpern gegen *Chlamydia spp.* untersucht. Im Anschluss daran wurden diejenigen Patientenserum, bei denen Antikörper gegen genusspezifisches Lipopolysaccharid vorhanden waren (EIA +), auf das Vorkommen von Antikörpern (IgG und IgM) untersucht, die spezifisch gegen *C. pneumoniae* gerichtet waren. Als Methode wurde hierbei der Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) verwendet - der derzeit einzige Test, der eine speziesspezifische Unterscheidung der Chlamydienantikörper zulässt.

Die dann folgenden Schritte stellten die Untersuchung der Seren dar, die im MIF einen positiven IgG-Antikörper-Befund gegen *C. pneumoniae* gezeigt hatten:

Sie wurden zum einen auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das HSP-60 von *C. pneumoniae* untersucht. Hierbei erfolgte die Analyse zunächst mittels eines EIA unter Verwendung von rekombinantem HSP-60, wobei die Patientenserum mit positivem Antikörper-Befund im Anschluss nochmals mittels Immunoblotting auf das Vorliegen von Antikörpern gegen HSP-60 analysiert wurden. Zum anderen erfolgte eine Untersuchung, bei der die im MIF positiven Patientenserum bezüglich eines für *C. pneumoniae* spezifischen Reaktionsbandenmusters mittels Immunoblotting analysiert wurden.

6. ERGEBNISSE

6.1 Chlamydienkultur

Die Kultivierung von *C. pneumoniae* war erforderlich, um das für die immunologischen Untersuchungen benötigte Antigen herzustellen. Zur Kultivierung wurden HEp2-Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert, so dass sich nach 3-4 Tagen chlamydiale Einschlusskörper innerhalb der Zellen gebildet hatten (s. Abb. 6.1). Diese Einschlusskörper ließen sich mittels direktem oder indirektem Immunfluoreszenztest (s. Methoden, Kap. 5.2.7) nachweisen, wobei die semiquantitativ analysierten Infektionsraten bei durchschnittlich 60-70 Einschlüssen/Gesichtsfeld lagen, was einer sehr guten Infektionsrate entsprach. Die chlamydialen Partikel wurden nach Lyse der Zellen mittels Ultraschall über Urografin® gereinigt. Die im Anschluss durchgeführten Immunfluoreszenztests zeigten Dichten von 50-60 Elementarkörperchen/Gesichtsfeld. Als Antigen wurden über Urografin® gereinigte Elementarkörperchen verwendet.

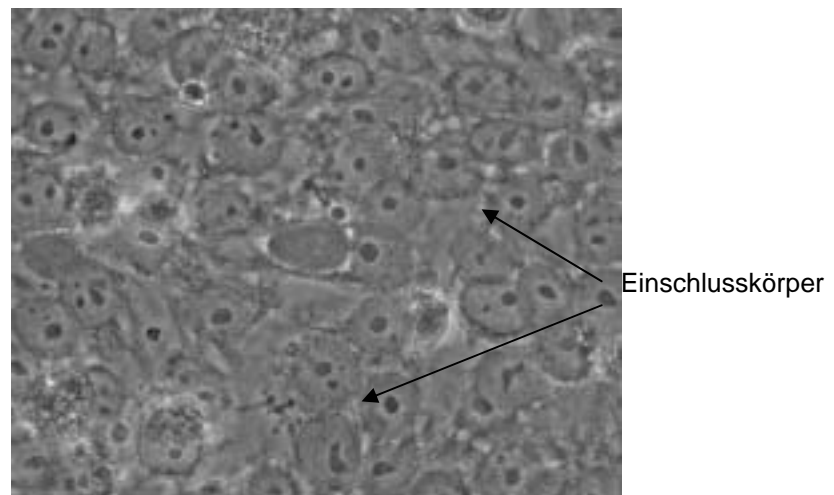


Abbildung 6.1: Kultur von HEp-2 Zellen
(Phasenkontrastmittelmikroskop)

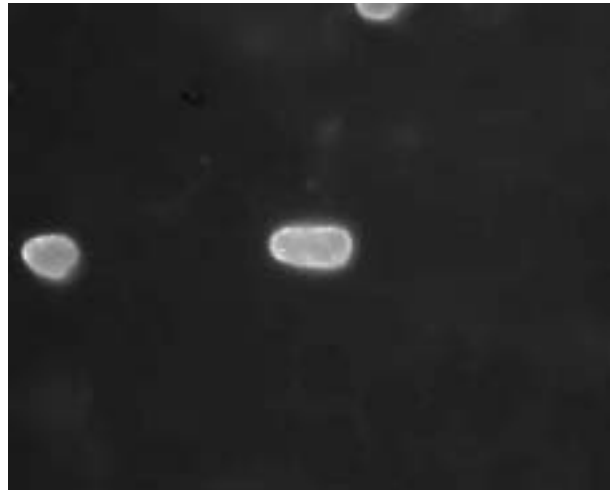


Abbildung 6.2: Einschlusskörper in HEP-2 Zellen
(Immunfluoreszenz)

6.2 Charakteristika des Patientenkollektivs

Von 752 Patienten, die zu diagnostischen Zwecken einer koronarangiographischen Untersuchung am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unterzogen wurden, wurden in den Jahren 1997 und 1998 nach mündlichem Einverständnis Serumproben im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung entnommen. Unter den Patienten befanden sich 540 (72 %) männliche und 212 (28 %) weibliche Patienten. Das mittlere Alter des Gesamtkollektivs betrug 61,7 (\pm 9,7) Jahre.

6.2.1 Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren

Um Angaben über Risikofaktoren für die Erkrankung an einer Atherosklerose bzw. im speziellen an einer Koronaren Herzkrankheit zu erhalten, wurden die Patienten mit einem standardisierten Fragebogen befragt sowie entsprechende Blutanalysen durchgeführt. Insgesamt wiesen 710 Patienten (94 %) mindestens einen der im Folgenden genannten Risikofaktoren auf:

1. Gesamtcholesterin > 200 mg / dl

Bei 375 Patienten (50 %) der insgesamt 752 Patienten fanden sich Gesamtcholesterinspiegel \geq 200 mg / dl.

2. Hypertonie (RR > 160 / 95 mmHg)

549 Patienten (73 %) der untersuchten Patienten litten an arterieller Hypertonie.

3. Diabetes mellitus

An Diabetes mellitus waren 159 Patienten (21 %) erkrankt.

4. Nikotinabusus

Insgesamt 387 der Patienten (51 %) waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung Raucher.

Tabelle 1: Charakteristika des Patientenkollektivs

Patientengruppe /Risikofaktor	Patientenanzahl (%)
Männlich	540 (72)
Weiblich	212 (28)
Gesamtcholesterinspiegel >200 mg / dl	375 (50)
Arterieller Hypertonus	549 (73)
Diabetes mellitus	159 (21)
Nikotinabusus	387 (51)
Vorangegangener Myokardinfarkt	275 (36)

Alter ($p = 0,001$), Geschlecht ($p = 0,0001$), Diabetes mellitus ($p = 0,2$) und arterielle Hypertonie ($p = 0,006$) wurden als Risikofaktoren bestätigt.

6.2.2 Koronarangiographischer Befund

Die Patienten wurden aufgrund des koronarangiographischen Befundes in folgende Gruppen unterteilt:

1. Vollständig unauffällige Angiographie (Gensini-Score: 0)

Bei 155 Patienten (21 %) fanden sich keine angiographischen Anzeichen für eine Koronare Herzkrankheit, d.h. der berechnete Gensini-Score (s. Methoden, Kap. 5.7) betrug 0.

2. Keine Koronare Herzkrankheit (Gensini-Score > 0 und Koronarstenose < 50 %)

Hierbei wiesen 108 (14 %) der betroffenen Patienten einen Gensini-Score > 0 auf, jedoch einen Stenosegrad der Koronarien < 50 %, d.h. sie wurden nicht der Gruppe der Patienten zugerechnet, die an einer Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung litten.

3. Koronare Herzkrankheit (Koronarstenose $\geq 50\%$)

In diese Gruppe wurden die Patienten aufgenommen, die mindestens eine Stenose der Koronararterien von $\geq 50\%$ besaßen. Insgesamt waren dies 489 Patienten (65 %). Die Gruppe der Patienten mit einer $\geq 50\%$ Stenose wurde in drei weitere Untergruppen unterteilt: So fanden sich 161 Patienten (33 %) mit einer Eingefäß-, 137 (28 %) mit einer Zweigefäß- und 191 Patienten (39 %) mit einer Dreigefäßkrankung.

Die unter 1. und 2. aufgeführten Patientengruppen wurden als Kontrollgruppen in der vorliegenden Studie verwendet.

Eine Koronarangiographie wurde bei 109 Patienten aufgrund typischer pectanginöser Beschwerden und bei 154 zum Ausschluss einer Koronaren Herzkrankheit bei typischem Risikoprofil durchgeführt.

Ergänzt wurden diese Befunde durch anamnestisch erhobene Angaben über vorangegangene Myokardinfarkte: 275 Patienten (36 %) des Gesamtkollektivs wiesen in der Krankengeschichte ein solches Ereignis auf.

Tabelle 2: Klassifikation des Patientenkollektivs aufgrund des koronarangiographischen Befundes

Patientengruppe	Patientenanzahl (%)
vollständig unauffällige Angiographie ^a	155 (21)
keine Koronare Herzkrankheit ^b	108 (15)
Koronare Herzkrankheit ^c	489 (65)
Eingefäßkrankung	161 (22)
Zweigefäßkrankung	137 (18)
Dreigefäßkrankung	191 (25)

^a Gensini-Score = 0

^b Gensini-Score > 0 und < 50 %-Stenose

^c $\geq 50\%$ -Stenose

6.3 Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae*

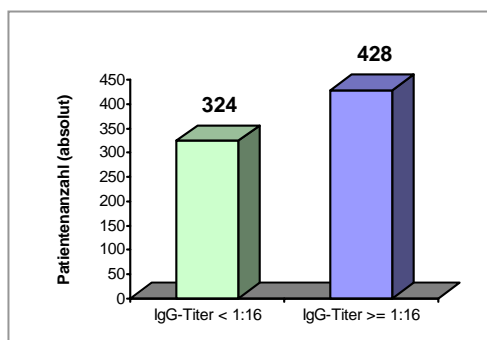
6.3.1 Nachweis gegen chlamydiales Lipopolysaccharid (LPS) gerichteter Immunglobuline der Klasse G (IgG) mittels Enzymimmunoassay (EIA)

Alle Patientenseren wurden einem “Screening” unterzogen, um zunächst einen Überblick darüber zu erhalten, wieviele Patienten innerhalb des Gesamtkollektivs Antikörper gegen Chlamydien besitzen, wobei Speziesunterschiede hier unberücksichtigt blieben. Alle 752 Patientenseren wurden mittels eines Chlamydien IgG rELISA auf Immunglobuline der Klasse G, die gegen chlamydiales LPS gerichtet sind, untersucht: Von den 752 Patientenseren zeigten 451 Patienten (60 %) ein positives Testergebnis, wobei der Nachweis anderer Immunglobulinklassen nicht durchgeführt wurde.

6.3.2 Nachweis von Immunglobulinen der Klasse M und G gegen *Chlamydia pneumoniae* mittels Mikroimmunfluoreszenztest (MIF)

Um nicht nur einen Nachweis chlamydialer Antikörper, sondern auch einen spezifischen Nachweis von Antikörpern zu führen, die gegen *Chlamydia pneumoniae* gerichtet sind, wurde der einzige speziesspezifische Test, der Mikroimmunfluoreszenztest, angewandt.

6.3.2.1 Nachweis von IgG-Antikörpern

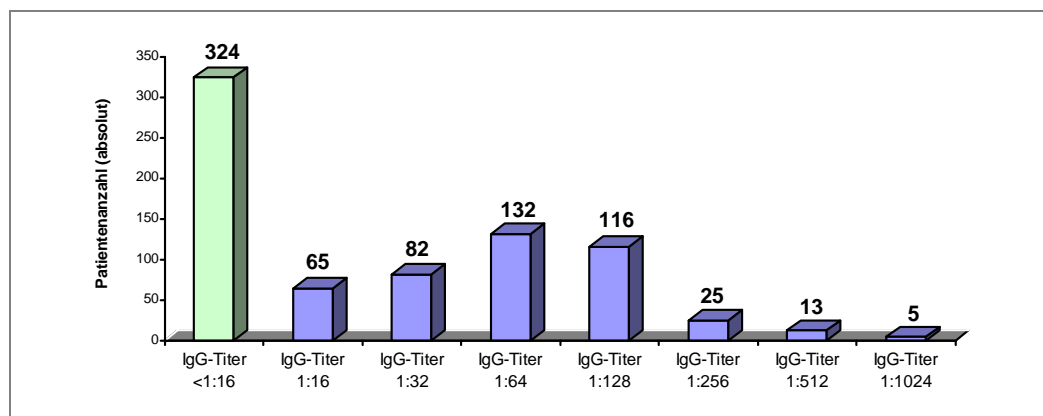


Die im Chlamydien IgG rELISA positiven Patientenseren wurden mittels des Mikroimmunfluoreszenztestes (MIF) auf *Chlamydia pneumoniae*-spezifische IgG untersucht. Die Patientenseren wurden seriell verdünnt und mit Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* inkubiert, die auf Objektträgern fixiert waren. Als Titer wurde die letzte Verdünnungsstufe des Serums angesehen, die eine deutliche Fluoreszenz mit den Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* zeigte. Antikörper-Titer $\geq 1:16$ wurden

als positives Testergebnis bewertet. *C. pneumoniae*-spezifische Antikörper wurden bei 428 (57 %) der Patienten nachgewiesen, wobei der höchste gemessene Antikörper-Titer bei 1:1024 lag. Insgesamt zeigten daher 324 Patienten (43 %) keinen positiven Antikörper-Befund.

6.3.2.2 Nachweis von IgM-Antikörpern

Die Patientenseren, die hinsichtlich vorhandener IgG-Antikörper untersucht wurden, wurden auch einer IgM-Analyse unterzogen. Hierbei wurden zunächst alle Seren in der Verdünnungsstufe 1:16 getestet. Lediglich zwei Seren wiesen zunächst ein IgM-positives Ergebnis auf, das jedoch in beiden Fällen - nach Rheumafaktor-Absorption und nochmaliger Austestung - als negativ bewertet werden musste. Eine Rheumafaktor-Absorption muss durchgeführt werden, weil es unter Umständen zu Kreuzreaktionen zwischen dem Sekundärantikörper (der gegen humanes IgM gerichtet ist) und im Blut zirkulierenden Rheumafaktoren (die ebenfalls der Immunglobulinklasse M angehören) kommen kann. Innerhalb des Patientenkollektivs ließen sich somit keine Patienten mit IgM-Antikörpern gegenüber *C. pneumoniae* finden.



6.4 *C. pneumoniae*-Seropositivität und Koronare Herzkrankheit

Aufgrund verschiedener Studien existieren Hinweise, dass Infektionen an der Pathogenese und Progression der Atherosklerose beteiligt sein könnten. In der vorliegenden Analyse wurde nach serologischen Hinweisen für eine Korrelation zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose gesucht. Hierzu wurden für das Patientenkollektiv die Ergebnisse des

Mikroimmunfluoreszenztestes mit den Daten aus den angiographischen Untersuchungen korreliert:

Bei Patienten, die im Mikroimmunfluoreszenztest einen IgG-Titer von $\geq 1:16$ aufwiesen, war bei 292 (68 %) eine Koronare Herzkrankheit (KHK) mit einer ≥ 50 %-igen Stenose nachzuweisen. Demgegenüber waren in der Gruppe der Patienten ohne KHK 136 (52 %) ohne nachgewiesene KHK (≤ 50 % Stenose) und einem positiven IgG-Mikroimmunfluoreszenztest (Multiple Regressionanalyse, $p = 0,007$). Hieraus ist ersichtlich, dass ein deutlich signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und einer angiographisch verifizierten ≥ 50 %-igen Stenose der Koronarien und somit der Koronaren Herzkrankheit bestand.

Tabelle 3: *C. pneumoniae*-Antikörper (IgG) und Koronare Herzkrankheit

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit <i>C. pneumoniae</i> -Antikörpern (IgG) *	
	negativ	positiv
Keine Koronare Herzkrankheit	127 (113,3)	136 (149,7)
Koronare Herzkrankheit	197 (210,7)	292 (278,3)

* Erwartungswerte in Klammern
Chi-Quadrat-Test, $p = 0,007$

6.4.1 Serumantikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein (HSP)

Die Untersuchung zielte gerade deshalb auf das Hitze-Schock-Protein 60 der Chlamydien, da dieses mit der Pathogenese chlamydialer Infektionen in Verbindung gebracht wird. Es existieren einige Untersuchungsergebnisse, die eine pathogenetisch bedeutsame Rolle der Hitze-Schock-Proteine im Rahmen der Atherosklerose möglich erscheinen lassen.

In dieser Studie wurde die humorale Immunantwort gegen das chlamydiale Hitze-Schock-Protein 60 und deren Zusammenhang mit einer Koronaren Herzkrankheit näher analysiert.

6.4.1.1 Darstellung des gereinigten Hitze-Schock-Proteins 60 von *C. pneumoniae*

Das Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* wurde in *E. coli* XL-1 blue exprimiert und über Ni-NT-Agarose gereinigt (s. Methoden, Kap. 5.4.2). In Abb. 6.5 ist das Bild eines mit Coomassie-Blau gefärbten SDS-Geles zu sehen, auf dem ein *E. coli* mit exprimiertem Hitze-Schock-Protein 60 (3) sowie das gereinigte, rekombinante Hitze-Schock-Protein 60 (1) aufgetragen wurden. Die mit (2) gekennzeichneten Banden entsprechen dem Molekulargewichtsmarker. Die Proteinbande des Hitze-Schock-Proteins 60 befindet sich charakteristischerweise bei 58 kDa. Mit Hilfe des gereinigten, rekombinanten Hitze-Schock-Proteins 60 (1) wurden die im Folgenden beschriebenen serologischen Untersuchungen durchgeführt.

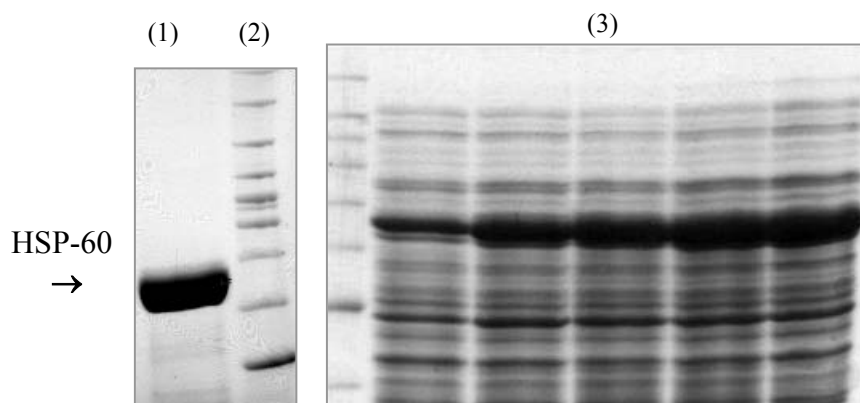


Abbildung 6.5:

6.4.1.2 Nachweis von IgG-Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 mittels Enzymimmunoassay(s) (EIA)

Die Seren der Patienten, die im Mikroimmunfluoreszenztest ein positives Ergebnis aufwiesen, wurden mittels Enzymimmunoassay(s) (EIA) auf IgG-Antikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 untersucht. Hierbei wurde gereinigtes, rekombinantes Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* als Antigen verwendet. Von 428 Patienten fanden sich 143 (33 %) mit Hitze-Schock-Protein 60-Antikörpern sowie 285 Patienten (67 %), bei denen keine Antikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 nachgewiesen werden

konnten. Als positiv galten die Seren, deren Wert für die optische Dichte größer war als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus der dreifachen Standardabweichung.

6.4.1.3 Nachweis von Immunglobulinen der Klasse IgG gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 mittels Immunoblots

Zur Bestätigung des im EIA analysierten Ergebnisses wurden die Seren, die im HSP-EIA ein positives Ergebnis zeigten, im Immunoblot gegen Hitze-Schock-Protein 60 der Chlamydien getestet. Auch hier fand gereinigtes, rekombinantes Hitze-Schock-Protein 60 als Antigen Verwendung. 125 (87 %) der 143 im Enzymimmunoassay als positiv bewerteten Patientenseren konnten im Immunoblot als positiv hinsichtlich vorhandener IgG gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 bestätigt werden.

6.4.2 HSP-Antikörper und Koronare Herzkrankheit

6.4.2.1 Zusammenhang zwischen HSP-Blot und Koronarer Herzkrankheit

Unter den 291 Patientenseren, bei denen eine Koronare Herzkrankheit vorlag, zeigten 84 (29 %) einen positiven HSP-Blot-Befund (Tabelle 4). 41 Seren (30 %) der Patienten ohne Koronare Herzkrankheit zeigten ebenfalls einen positiven HSP-Befund (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,751$). Hieraus wird deutlich, dass die Häufigkeit Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 in den Patientengruppen mit und ohne Koronare Herzkrankheit nahezu gleich ist (29 % vs. 30 %).

Tabelle 4: Immunantwort gegen das Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* und Koronare Herzkrankheit

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit <i>C. pneumoniae</i> -Hitze-Schock-Protein 60-Antikörpern (IgG)*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	95 (95,4)	41 (39,6)
Koronare Herzkrankheit	207 (205,6)	84 (85,4)

* Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, $p = 0,751$

Hinsichtlich des Schweregrades einer vorliegenden Koronaren Herzkrankheit wurde folgende Verteilung beobachtet:

Unter den Patienten mit einer Eingefäßerkrankung waren 56 (19 % aller Patienten mit Koronarer Herzkrankheit) mit einem negativen und 31 (11 %) mit einem positiven Hitze-Schock-Protein 60-Antikörper-Befund (Tabelle 5). Lag eine Zweigefäßerkrankung vor, so ließen sich 57 Patienten (20 %) ohne und 26 Patienten (9 %) mit Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 finden. 94 Seren (32 %) von Patienten mit einer Dreigefäßerkrankung zeigten keine gegen chlamydiales HSP gerichteten Antikörper, demgegenüber standen 27 Patienten (9 %) mit positivem HSP-Blot und einer Dreigefäßerkrankung.

Aus diesen Daten ist keine Korrelation zwischen dem Schweregrad einer Koronaren Herzkrankheit und dem Vorhandensein von IgG gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 festzustellen.

Tabelle 5: HSP-Antikörper und Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit <i>C. pneumoniae</i> -Hitze-Schock-Protein 60 Antikörpern (IgG) ^{°*}	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	95 (95,4)	41 (39,6)
Eingefäßerkrankung [°]	56 (61,5)	31 (25,5)
Zweigefäßerkrankung [°]	57 (58,6)	26 (24,4)
Dreigefäßerkrankung [°]	94 (85,5)	27 (35,5)

[°] = ≥ 50 % Gefäßstenose *Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, p = 0,249 (Eingefäßerkrankung), p = 0,280 (Zweigefäßerkrankung), p = 0,251 (Dreigefäßerkrankung)

6.4.2.2 Zusammenhang zwischen Antikörpern gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 und Myokardinfarkt

Unter den 428 Patientenseren, die auf chlamydiale Hitze-Schock-Protein 60 - Antikörper getestet wurden, befanden sich 259 Patienten (61 %) ohne Myokardinfarkt und 169 (39 %) mit einem solchen Ereignis in ihrer Anamnese. 116 der 169 Patienten mit Myokardinfarkt wiesen keine Antikörper gegen das

Hitze-Schock-Protein 60 auf, demgegenüber waren bei 53 Patienten Antikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 zu finden ($p = 0,458$).

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Hitze-Schock-Protein 60-Befund und einem früheren Myokardinfarkt bestand.

Tabelle 6: HSP-Antikörper und Myokardinfarkt

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit Hitze-Schock-Protein 60 IgG-Antikörpern*	
	negativ	positiv
kein Myokardinfarkt	186 (181,6)	73 (75,4)
Myokardinfarkt	116 (119,4)	53 (49,6)

* Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, $p = 0,458$

6.4.2.3 Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit und Konzentration der Hitze-Schock-Protein 60-Antikörper

Als ungefähres Maß für die Konzentration der Antikörper wurde die optische Dichte im Enzymimmunoassay (s. Methoden, Kap. 5.4) angesehen.

Es wurde analysiert, ob eine Korrelation zwischen den Werten für die optische Dichte und dem Schweregrad einer Koronaren Herzkrankheit besteht, d.h. ob mit steigender Antikörper-Konzentration eine vermehrte Stenosierung der Koronarien festzustellen ist.

Innerhalb der Patientengruppe mit einem Gensini-Score von 0 lag der Mittelwert der Extinktionen bei 0,337. Patienten ohne Koronare Herzkrankheit aber einer Stenose der Koronarien $< 50\%$ zeigten einen Mittelwert der optischen Dichten von 0,168. Die Gruppe der Patienten, die an einer nachgewiesenen Koronaren Herzkrankheit litten, wiesen einen Mittelwert von 0,244 auf.

Bei Unterteilung dieser Gruppe in Patienten mit einer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung fand sich ein Mittelwert von 0,287 bei einer bestehenden Eingefäßerkrankung, ein Mittelwert von 0,271 bei einer Zweigefäß- und ein Mittelwert von 0,195 bei einer Dreigefäßerkrankung (Kruskall-Wallis-Test, $p = 0,143$).

Wie aus diesen Daten ersichtlich ist, ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Antikörperkonzentration und dem Ausmaß einer Koronaren Herzkrankheit.

Bei der Analyse der Verteilung der Extinktionswerte bei abgelaufenem Myokardinfarkt, fand sich ebenfalls keine signifikante Korrelation: Patienten mit Myokardinfarkt zeigten einen ähnlichen Mittelwert wie Patienten ohne Myokardinfarkt (0,259 vs. 0,246; Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,776$).

6.5 Immunoblot-Ergebnisse

Das Immunoblot-Reaktions-Bandenmuster bei *C. pneumoniae* ist variabel - es läßt sich kein bestimmtes, immer wiederkehrendes Bandenmuster feststellen. Vielmehr findet sich eine Vielzahl von Banden im Bereich von 17 kDa - 100 kDa [Puolakkainen et al. 1993]. Eine häufig prominente Reaktionsbande im Rahmen der Immunoblotanalyse stellt die des Major Outer Membrane Proteins bei ca. 40 kDa dar.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob ein eventuell charakteristisches Reaktionsbandenmuster bei Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit zu detektieren war.

6.5.1 Reaktionsbandenmuster innerhalb des gesamten Patientenkollektivs

Bei den Immunoblot-Analysen von Patientenseren, die im Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) IgG-Antikörper gegen *C. pneumoniae* aufwiesen, wurden Reaktionen mit Proteinen im Bereich von 17 kDa - 100 kDa beobachtet. Da keine einheitlichen Reaktionsbandenmuster festzustellen waren, seien hier stellvertretend für das gesamte Patientenkollektiv vier Immunoblots, die die Vielfalt der häufigsten Banden zeigten, näher beschrieben:

Das Patientenserum 539 (Abb. 6.6) zeigte zum einen Reaktionsbanden von Proteinen mit Molekulargewichten von ungefähr 100 kDa. Bei diesen Banden könnte es sich um die Gruppe der sog. „Putative membrane proteins“ (Pmp) gehandelt haben. Diese Gruppe von Proteinen wurde im Rahmen der Sequenzierung des *C. pneumoniae*-Genoms beschrieben. Zum anderen folgten Reaktionsbanden bei 76 und 68 kDa sowie weitere, schwächere Banden bei 63 und 48 kDa. Auffallend war die sich anschließende, sehr prominente Bande bei 40 kDa, das Major Outer Membrane Protein (MOMP). Wie häufiger zu beobachten, folgte diesem eine schwache Bande bei 38 kDa. Weiterhin waren immunoreaktive Banden bei 31 und 25.5 und 19 kDa festzustellen.

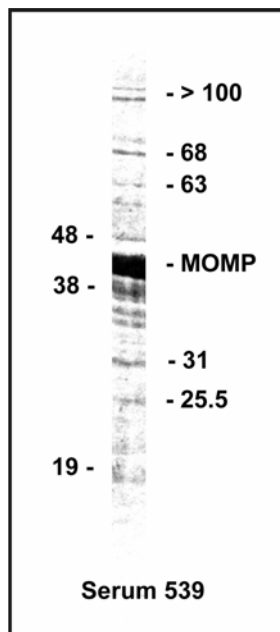
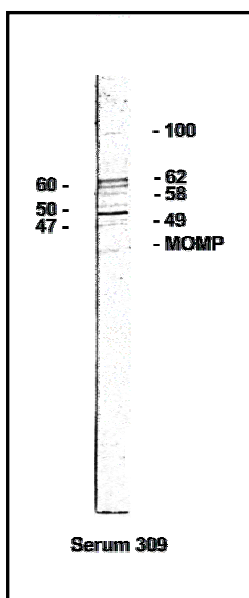


Abbildung 6.6: Patientenserum 539

Ebenso wie Patientenserum 231 (s.u.) und 539 zeigte dieses bei ca. 100 kDa Reaktionsbanden. Auffallend waren die darauffolgenden drei reaktionsschwächeren Banden bei 62, 60 und 58 kDa,



wobei die Bande des Proteins bei 58 kDa der des Hitze-Schock-Proteins 60 entsprach, da dieses Serum im Hitze-Schock-Protein 60-Blot ein positives Ergebnis zeigte. Weitere Reaktionen fanden sich bei 50, 49 und 47 kDa. Die Reaktionsbande des MOMP war jedoch - im Vergleich zu Serum 231 und 539 - sehr schwach.

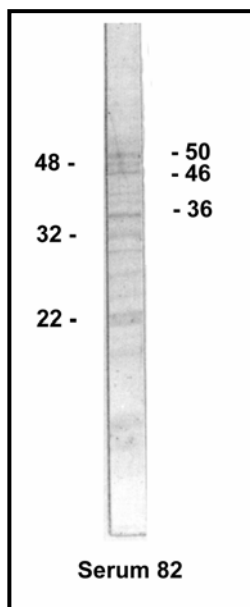
Abbildung 6.7: Patientenserum 309

6.5.2 Immunoblots von Patienten mit und ohne Koronare Herzkrankheit

Die Immunoblots der Patienten mit koronarangiographisch belegter Koronarer Herzkrankheit zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den Patienten mit negativem KHK-Befund. Auch hier fand sich eine Vielfalt von Reaktionsbanden im Bereich von 17 kDa - 100 kDa, die keine eindeutige Interpretation eines charakteristischen Bandenmusters zuließ. Stellvertretend werden hier je zwei Immunoblots von Patienten mit und ohne Koronare Herzkrankheit näher beschrieben:

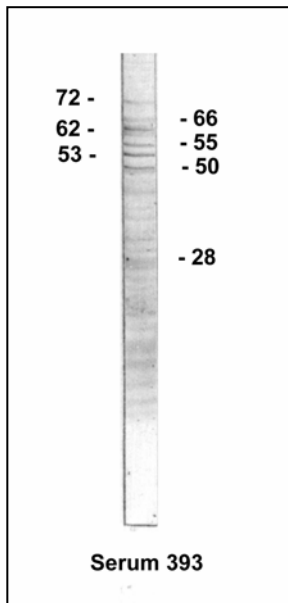
6.5.2.1 Immunoblot-Befund bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit

Die Seren 82 und 393 stammten von Patienten mit schwerer Koronarer Herzkrankheit, wobei der Patient mit Serum 82 einen Gensini-Score von 320 (höchster erhobener Wert innerhalb des Patientenkollektivs) und eine ≥ 50 %-ige Stenose, der Patient mit Serum 393 einen Gensini-Score von 267 und eine Stenose von ≥ 50 % aufwiesen.



Bei Patientenserum 82 fanden sich Reaktionsbanden von Proteinen, die ein Molekulargewicht von 50, 48 und 46 kDa besaßen. Es folgten weitere Reaktionsbanden bei 36, 32 und 22 kDa. Hinsichtlich des Hitze-Schock-Proteins 60 war dieses Serum negativ.

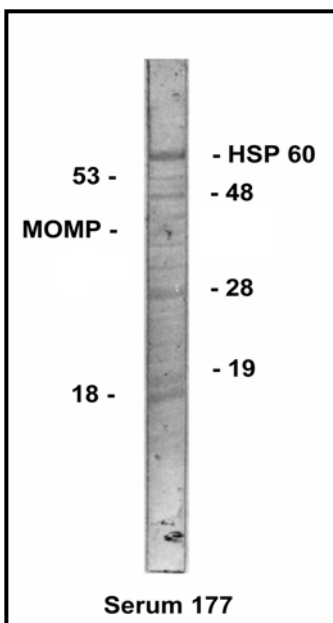
Abbildung 6.8: Patientenserum 82



Patientenserum 393 wies eine Vielzahl von Reaktionsbanden auf, wobei sich das größte Molekulargewicht, in dessen Bereich eine Bande zu detektieren war, bei 72 kDa befand. Diesem folgten in kleinen Abständen Reaktionsbanden der Proteingrößen 66, 62, 55, 53 und 50 kDa. Hieran schlossen sich weitere Banden bis zu einer Größe von 28 kDa an; eine Hitze-Schock-Protein 60-Bande zeigte dieses Serum nicht.

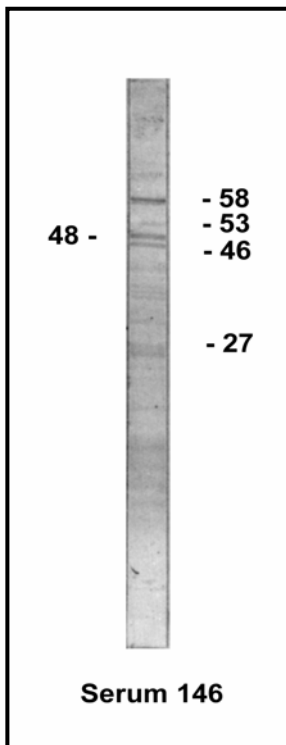
Abbildung 6.9: Patientenserum 393

6.5.2.2 Immunoblot-Befund bei Patienten ohne Koronare Herzkrankheit



Patient mit Serum 177 zeigte einen Gensini-Score von 0 und folgendes Reaktionsbandenmuster: Beginnend mit 60 kDa – das Serum war bezüglich Antikörpern (IgG) gegen Hitze-Schock-Protein 60 positiv - folgten die Proteingrößen 53, 48, 40 kDa (MOMP). Weitere Banden waren bei 28, 19 und 18 kDa zu beobachten.

Abbildung 6.10: Patientenserum 177



Der Patient mit Serum 146 wies ebenfalls einen Gensini-Score von 0 auf. Sein Reaktionsmuster des Immunoblots zeigte die Bande des größten Proteins bei 58 kDa, zudem ließ sich im separat durchgeführten Hitze-Schock-Protein 60-Blot ein positives Ergebnis finden, so dass dieses Protein dem HSP entsprechen musste. Es folgten immunoreaktive Banden bei 53, 48, und 46 kDa. Eine Bande in der erwarteten Höhe des MOMP (40 kDa) ließ sich nicht erkennen. Weiterhin war eine Bande im Bereich des Molekulargewichts 27 kDa zu detektieren.

Abbildung 6.11: Patientenserum 146

6.5.3 Immunantwort gegen häufig detektierte *C. pneumoniae*-Proteine und KHK

Die Immunoblots wurden hinsichtlich der Reaktionsbanden analysiert, die bei allen getesteten Patientenseren am häufigsten gefunden worden waren:

Es waren dies die Banden der Proteine mit den Molekulargewichten 62, 60, 58 und 17 kDa sowie die des MOMP (40 kDa).

6.5.3.1 Major Outer Membrane Protein (MOMP)

6.5.3.1.1 Allgemeines

Alle Immunoblots, von denen ein *C. pneumoniae*-Reaktionsbandenmuster angefertigt wurde, wurden bezüglich des Vorhandenseins von Antikörpern (IgG) gegen das MOMP untersucht. Hierbei konnte bei 137 Patienten (39 %) eine Reaktionsbande in Höhe des MOMP (40 kDa) gefunden werden, während 211 Patienten (61 %) keine Reaktion zeigten. In den oben aufgeführten Abbildungen sind beispielhaft Seren mit und ohne Reaktion mit dem MOMP zu sehen: Serum 146 (s. Abb. 6.11) ohne MOMP, Serum 393 (s. Abb. 6.9) und 539 (s. Abb. 6.6) mit MOMP.

6.5.3.1.2. MOMP und Immundominanz

Es existieren widersprüchliche Forschungsergebnisse hinsichtlich der Frage, ob dem Major Outer Membrane Protein innerhalb der immunologischen Antwort auf eine chlamydiale Infektion Immundominanz zukommt [z.B. Iijima et al. 1994]. In dieser Studie wurde analysiert, ob eine Korrelation zwischen einem hohen Titer ($\geq 1:64$) im Mikroimmunfluoreszenztest und einer positiven Reaktion im Immunoblot besteht, was für eine Immundominanz des MOMP sprechen könnte.

Hierbei wurden folgende Ergebnisse festgestellt: 143 (68 %) der 211 Patienten mit einem negativen Blotbefund hinsichtlich des Major Outer Membrane Protein(s) zeigten im Mikroimmunfluoreszenztest einen Antikörper-Titer (IgG) $\geq 1:64$, während in der Patientengruppe mit positivem MOMP-Blotbefund 89 der 137 Patienten (65 %) einen IgG-Titer von $\geq 1:64$ aufwiesen (Tabelle 6 ist eine differenziertere Einteilung bezüglich der Titerstufen zu entnehmen). Eine signifikante Korrelation zwischen einem hohen Titer im MIF ($\geq 1:64$) und einem positiven MOMP-Blotbefund bestand nicht ($p = 0,339$).

Tabelle 6: MOMP-Antikörper und MIF

	Anzahl der Patientenseren mit MOMP-Antikörpern (IgG)*	
	negativ	positiv
MIF-IgG-Titer negativ	0 (6)	1 (4)
MIF-IgG-Titer 1:16	28 (26,1)	15 (16,9)
MIF-IgG-Titer 1:32	40 (43,7)	32 (28,3)
MIF-IgG-Titer 1:64	58 (61,2)	43 (39,8)
MIF-IgG-Titer 1:128	62 (57,6)	33 (37,4)
MIF-IgG-Titer 1:256	15 (13,9)	8 (9,1)
MIF-IgG-Titer 1:512	8 (6,7)	3 (4,3)
MIF-IgG-Titer 1:1024	0 (1,2)	2 (8)

* Erwartungswerte in Klammern

6.5.3.1.3. Anti-MOMP-Antikörper und Koronare Herzkrankheit

Unter den 211 Patienten, die keine Reaktion mit dem MOMP im Immunoblot zeigten, befanden sich 128 (61 %) mit und 83 (39 %) ohne Koronare Herzkrankheit. 91 (66 %) der 137 Patientenserum mit Antikörpern gegen das Major Outer Membrane Protein waren der Patientengruppe mit KHK zuzurechnen. Demgegenüber standen 46 Patienten (34 %) ohne KHK, aber mit MOMP-Antikörpern. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,277$) zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern gegen das MOMP und einer Koronaren Herzkrankheit bestand.

Tabelle 7: Immunantwort gegen das MOMP und KHK

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit MOMP-Antikörpern (IgG)*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	83 (78,2)	46 (50,8)
Koronare Herzkrankheit	128 (132,8)	91 (86,2)

* Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, $p = 0,437$

Unterteilte man die Gruppe der an KHK erkrankten Patienten weiter anhand der Unterscheidung einer Ein-, Zwei- und Dreifäßerkrankung, so wird aus Tabelle 8 ersichtlich, dass sich auch hier kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit und dem Vorhandensein von MOMP-Antikörpern finden ließ: Sowohl in der Gruppe mit als auch in der Gruppe ohne MOMP-Antikörper fanden sich bei den an KHK Erkrankten die meisten Patienten in der Gruppe mit einer Dreifäßerkrankung.

Tabelle 8: Immunantwort gegen das MOMP von *C. pneumoniae* und Schweregrad der KHK

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit MOMP-Antikörpern (IgG)*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	83 (78,2)	46 (50,8)
Eingefäßerkrankung	26 (29,7)	23 (19,3)
Zweigegefäßerkrankung	36 (35,2)	22 (22,8)
Dreigegefäßerkrankung	66 (67,9)	46 (44,1)

* Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, $p = 0,551$

Bei Betrachtung des Zusammenhanges zwischen einem Myokardinfarkt in der Krankengeschichte und einem positiven MOMP-Antikörper-Befund wurde deutlich, dass auch hier kein Zusammenhang bestand: 57 (42 %) von 137 Patienten mit MOMP-Antikörpern standen 80 von 211 (38 %) Patienten ohne MOMP-Antikörper mit Myokardinfarkt gegenüber ($p = 0,491$).

Tabelle 9: Immunantwort gegen das MOMP von *C. pneumoniae* und Myokardinfarkt

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit MOMP-Antikörpern (IgG)*	
	negativ	positiv
kein Myokardinfarkt	131 (127,9)	80 (83,1)
Myokardinfarkt	80 (85,1)	57 (53,9)

* Erwartungswerte in Klammern

Chi-Quadrat-Test, $p = 0,491$

6.5.3.2 Immunantwort gegen das 62 kDa-Protein

Insgesamt 49 (14 %) der 348 Patientenserum wiesen eine Reaktionsbande mit dem 62 kDa-Protein auf, dementsprechend zeigten 299 (86 %) Patientenserum keine Reaktion. Hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen einer Reaktion mit dem Protein bei 62 kDa und einer bestehenden KHK (≥ 50 % Stenose) ließen sich

folgende Aussagen treffen: 28 (13 %) der 219 getesteten Seren von Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit zeigten eine Reaktion mit dem 62 kDa-Protein, wohingegen 191 (87 %) zwar an einer KHK litten, jedoch nicht mit dem Protein reagierten. Bei Betrachtung der Patienten hinsichtlich einer Ein-, Zwei- oder Dreigeßäßerkrankung und einer Reaktion ihres Serums mit dem 62 kDa-Protein, ließ sich folgende Verteilung beobachten:

21 der 49 Patienten (43 %) mit einer Reaktion gegenüber dem 62 kDa-Protein waren nicht an einer KHK erkrankt. 6 der 49 Patienten (12 %) litten an einer Eingefäßerkrankung, 9 (18 %) an einer Zweigeßäßerkrankung und 13 (27 %) an einer Dreigeßäßerkrankung, d.h. insgesamt 47 % der Patientenserum der Gruppe mit KHK reagierten mit einem Protein im Bereich von 62 kDa. Hieraus ist ersichtlich, dass keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Reaktionsbande bei 62 kDa und der Erkrankung an einer Koronaren Herzkrankheit bestand (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,365$). Ebenso zeigte sich dies unabhängig vom Schweregrad der KHK ($p = 0,725$). Auch hinsichtlich eines Myokardinfarktes und einer Reaktionsbande bei 62 kDa ließ sich kein signifikanter Zusammenhang beobachten ($p = 0,927$).

Tabelle 10: Immunantwort gegen das 62 kDa-Protein von *C. pneumoniae* und Koronare Herzkrankheit

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit Antikörpern (IgG) gegen 62 kDa*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	108 (110,8)	21 (18,2)
Eingefäßerkrankung	43 (42,1)	6 (6,9)
Zweigeßäßerkrankung	49 (49,8)	9 (8,2)
Dreigeßäßerkrankung	99 (96,2)	13 (15,8)
kein Myokardinfarkt	181 (181,3)	30 (29,7)
Myokardinfarkt	118 (117,7)	19 (19,3)

* Erwartungswerte in Klammern

6.5.3.3 Immunantwort gegen das 60 kDa-Protein

Unter den 348 Patientenseren, von denen ein Immunoblot angefertigt wurde, waren 50 (14 %), die eine Reaktion mit dem 60-kDa-Protein zeigten. Von diesen 50 Patienten mit einer Reaktionsbande hatten 28 (56 %) eine ≥ 50 %-ige Stenose, 22 zeigten keinen Anhalt für das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit ($p = 0,273$). Die Verteilung dieser an einer Koronaren Herzkrankheit leidenden Patienten bezüglich einer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung war folgendermaßen: 5 der 50 Patienten (10 %) mit Antikörpern gegen das 60 kDa-Protein wiesen eine Eingefäßerkrankung auf, 7 (14 %) eine Zweigefäßerkrankung und 16 (32 %) eine Dreigefäßerkrankung ($p = 0,638$).

Aus diesen Ergebnissen war kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Reaktion mit dem 60 kDa-Protein und einer bestehenden KHK oder deren Unterteilung in eine Ein- oder Mehrgefäßerkrankung zu erkennen. Dies galt ebenso für einen positiven Myokardinfarkt-Befund und das gleichzeitige Auftreten der Reaktionsbande bei 60 kDa ($p = 0,177$).

Tabelle 11: Immunantwort gegen das 60 kDa-Protein von *C. pneumoniae* und KHK

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit Antikörpern (IgG) gegen 60 kDa*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	107 (110,5)	22 (18,5)
Eingefäßerkrankung	44 (42,0)	5 (7,0)
Zweigefäßerkrankung	51 (49,7)	7 (8,3)
Dreigefäßerkrankung	96 (95,6)	16 (16,1)
kein Myokardinfarkt	185 (180,7)	26 (30,3)
Myokardinfarkt	113 (117,3)	24 (19,7)

* Erwartungswerte in Klammern

6.5.3.4 Immunantwort gegen das 58 kDa-Protein

In die Gruppe der Seren, die eine Reaktion mit diesem Protein (58 kDa) aufwiesen, wurden nur die einbezogen, die keinen positiven Befund hinsichtlich des Hitze-Schock-Proteins 60 zeigten, da dieses ebenso ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa besitzt.

Es fanden sich unter den 36 Seren mit Antikörpern gegen das 58 kDa-Protein 22 (61 %) Patienten mit einer Koronaren Herzerkrankung. Demgegenüber wiesen in der Patientengruppe ohne Antikörper gegen das Protein 197 Patienten (57 %) eine KHK auf. Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass keine signifikante Korrelation zwischen einer bestehenden KHK und dem Auftreten einer Reaktionsbande bei 58 kDa zu analysieren war (61 % vs. 57 %; $p = 0,811$). Ebenso galt dies sowohl für einen Zusammenhang zwischen einer Ein-oder Mehrgefäßerkrankung und einer Reaktion mit dem 58 kDa-Protein ($p = 0,804$) als auch für einen Zusammenhang zwischen einem anamnestisch erfaßten Myokardinfarkt und der Reaktion mit dem Protein ($p = 0,082$).

Tabelle 12: Immunantwort gegen das 58 kDa-Protein von *C. pneumoniae* und KHK

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit Antikörpern (IgG) gegen 58 kDa*	
	negativ	positiv
keine Koronare Herzkrankheit	115 (115,7)	14 (13,3)
Eingefäßerkrankung	43 (43,9)	6 (5,1)
Zweigegefäßerkrankung	54 (52,0)	4 (6,0)
Dreigegefäßerkrankung	100 (100,4)	12 (11,6)
kein Myokardinfarkt	194 (189,2)	17 (21,8)
Myokardinfarkt	118 (122,8)	19 (14,2)

* Erwartungswerte in Klammern

6.5.3.5 Immunantwort gegen das 17 kDa-Protein

Insgesamt 47 Patientenseren (14 %) aller im Immunoblot getesteten Seren wiesen Antikörper (IgG) gegen ein Protein mit dem Molekulargewicht von 17 kDa auf. Davon zeigten 26 Patienten (55 %) eine ≥ 50 %-ige Stenose der Koronarien, 21 (45 %) wiesen hinsichtlich einer KHK einen negativen Befund auf ($p = 0,245$).

Mittels dieser Analyse und ebenso bei Betrachtung der Daten bezüglich einer Ein-oder Mehrgefäßerkrankung und dem Vorhandensein von Antikörpern gegen das 17 kDa-Protein ließ sich jeweils keine signifikante Korrelation erkennen ($p = 0,438$).

Dieses galt auch für einen positiven Reaktionsbefund gegenüber dem 17 kDa-Protein und einem Myokardinfarkt: 20 Patienten (43 %) der 47 mit Antikörpern gegen das Protein hatten zum Zeitpunkt der Datenerhebung bereits einen Myokardinfarkt erlitten, und 27 Patienten (57 %) wiesen kein solches Ereignis in ihrer Anamnese auf ($p = 0,631$).

Tabelle 13: Immunantwort gegen das 17 kDa-Protein von *C. pneumoniae* und Koronare Herzkrankheit

Patientengruppe	Anzahl der Seren mit Antikörpern (IgG) gegen 17 kDa*	
	negativ	positiv
Keine Koronare Herzkrankheit	108 (111,6)	21 (17,4)
Eingefäßerkrankung	41 (42,4)	8 (6,6)
Zweigefäßerkrankung	53 (50,2)	5 (7,8)
Dreigefäßerkrankung	99 (96,9)	13 (15,1)
kein Myokardinfarkt	184 (182,5)	27 (28,5)
Myokardinfarkt	117 (118,5)	20 (18,5)

* Erwartungswerte in Klammern

7. DISKUSSION

7.1 Atherogenese und *C. pneumoniae*-Infektion

Die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßläsionen ist Ursache für die Entwicklung eines Myokardinfarktes, eines Apoplexes und einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, und dies ist der wesentliche pathogenetische Vorgang, der letztlich für ca. 50 % der Gesamtmortalität in den USA, Europa und Japan verantwortlich ist [Ross 1993]. Aufgrund dessen kommt der Erforschung der pathogenetischen Mechanismen der Atherosklerose große Bedeutung zu.

Es existieren derzeit verschiedene Hypothesen, wie es zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen kommt: Die wohl wichtigste, 1973 durch Ross offiziell eingeführte, sog. „response to injury“-Theorie, geht davon aus, dass es durch verschiedene exogene Einflüsse, wie beispielsweise Infektionen, Hitze, Hyperlipidämie (oxLDL, Hyperhomocysteinämie) etc. zu einer endothelialen Dysfunktion kommt [Ross 1973]. Diese wiederum ist die Voraussetzung für die verstärkte Adhäsion von T-Lymphozyten und Monozyten am geschädigten Endothel nach einer vermehrten Ausbildung von Adhäsionsfaktoren. Nach Penetration der Monozyten in das Endothel kommt es aufgrund von Lipidakkumulation subendothelial zur Ausbildung sog. Schaumzellen, die gemeinsam mit T-Lymphozyten und Muskelzellen im Bereich der Intima die Substanz der sog. Lipidflecken bilden [Ross 1993]. Diese stellen das Primärstadium der Atherosklerose dar und nehmen im Fortschreiten der Erkrankung an Zell- und Lipidgehalt zu, bis schließlich das Endstadium der in das Gefäßlumen hineinreichenden fibrösen Plaques (bestehend aus einem Lipidkern, umgeben von Makrophagen, glatten Muskelzellen, T-Lymphozyten, kollagenreichem Bindegewebe sowie überzogen mit einer sog. fibrösen Kappe) entstanden ist [Ross 1993]. Bei weiterer Zunahme des Zell- und Lipidgehaltes besteht ferner die Möglichkeit, dass Makrophagen durch Verdrängung endothelialer Zellen erneut Kontakt zur Zirkulation erhalten und so in Bereichen mit turbulentem Blutstrom, wie z. B. an Gefäßbifurkationen, zur Thrombozytenaggregation und -adhäsion führen. So können Thromben entstehen, deren Thrombozyten - neben den durch die aktivierten Makrophagen

und glatten Muskelzellen produzierten Wachstumsfaktoren - ebenso Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren, die letztlich zum weiteren Fortschreiten der atherosklerotischen Läsionen führen [Ross 1993]. In allen beschriebenen Stadien besteht jedoch die Möglichkeit der Reversibilität der Läsionen, vorausgesetzt, der zur endothelialen Dysfunktion führende Faktor kann beseitigt werden und/oder protektive Faktoren können Einfluss finden, wobei dies - bedenkt man die bislang als vorrangig eingeschätzten und oben bereits erwähnten potentiell reversiblen Ursachen der endothelialen Dysfunktion wie Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Nikotin [Ross 1993] - eher unwahrscheinlich ist, da es sich hierbei um zumeist dauerhafte und bestenfalls episodische Einflüsse handelt [Ross 1993].

Da die beschriebene endotheliale Dysfunktion nicht nur durch die bislang bekannten Risikofaktoren (Hyperlipidämie, Nikotin, arterielle Hypertonie etc.), sondern auch durch ein infektiöses (lokal oder systemisches) Geschehen bedingt sein könnte (bakterielles Endotoxin, TNF- α inhibieren z. B die endotheliale Produktion von NO [Wang 1994]), hat sich in den letzten Jahren das Interesse zunehmend auf diesen pathogenetischen Aspekt gerichtet. Denn so wäre - falls ein infektiöses Agens die Ursache der Atherogenese darstellte - eine schwerwiegende Erkrankung durch eine relativ einfache antibiotische Therapie einzudämmen und zu therapieren.

Erste Studien, die den infektiösen Aspekt im Rahmen der Atherosklerose betonen, sind bereits 1921 [Ophuls] sowie 1943 und 1945 [Ambrosetti et al. 1943, Coutts et al. 1945] erschienen. Bei Ambrosetti und Coutts et al. wurde eine Gemeinsamkeit hinsichtlich der Ätiologie zwischen den im Rahmen eines Lymphogranuloma venereum auftretenden obstruierenden und sklerosierenden Prozessen (Strikturen im Bereich von Pharynx, Trachea oder Rektum) und der Atherosklerose beschrieben. 1973 und 1978 wurden durch Benditt et al. bzw. Fabricant et al. weitere Studien veröffentlicht, die virale Organismen als Ursache für die Bildung von Cholesterinkristallen im Bereich von Gefäßen beschrieben: Sie konnten die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei Hühnern durch deren Infektion mit Herpesviren (sog. „Marek’s disease virus“ - eine Gruppe von Herpesviren bei Vögeln) induzieren [Fabricant et al. 1978].

Erreger, die seither immer wieder in den pathogenetischen Zusammenhang gestellt worden sind, sind: das Herpes simplex virus (HSV), das

Cytomegalievirus (CMV), das Bakterium *Helicobacter pylori* und das in dieser Studie untersuchte Bakterium *Chlamydia pneumoniae* [Saikku et al. 1988, Thom et al. 1991, Linnanmäki et al. 1993, Kol et al. 1998].

Beobachtungen, die eine Beteiligung von *C. pneumoniae* bei der Pathogenese der Atherosklerose möglich erscheinen lassen, sind:

- eine hohe Seroprävalenz (z.B. für *C. pneumoniae* 40-60 %) in der Normalbevölkerung, was mit der häufigen Manifestation der Atherosklerose korrelieren könnte [Grayston et al. 1989],
- häufig rekurrende oder chronisch persistierende Infektionen, die der zumeist langsamen Progredienz der Atherosklerose entsprächen [Kol et al. 1998],
- bei *C. pneumoniae* gilt eine Herzbeteiligung (in Form einer Myo- oder Endokarditis) im Rahmen einer Infektion als gesichert [Odeh et al. 1992],
- in Bezug auf *C. pneumoniae* ist bekannt, dass eine Vermehrung in mononukleären Phagozyten möglich ist - und somit auch innerhalb der Alveolarmakrophagen, wodurch eine rasche Anbindung der Bakterien oder deren Bestandteile an die Zirkulation bzw. das Gefäßsystem gewährleistet ist [Black et al. 1990] und
- schließlich besteht die Möglichkeit einer Infektion von Gefäßzellen (Endothelzellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen) durch *C. pneumoniae* in vitro [Godzik et al. 1995].

Bislang wurden zahlreiche Studien, die einen solchen Zusammenhang untersuchten, durchgeführt: Hierbei wurden zum einen serologische Analysen angefertigt, die versuchten, eine Korrelation zwischen einem positiven Antikörperbefund gegenüber dem Mikroorganismus und der gleichzeitigen Erkrankung an der Atherosklerose nachzuweisen [Saikku et al. 1988, Thom et al. 1991]. Zum anderen versuchte man einen entsprechenden Zusammenhang durch einen vermehrten Nachweis der Erreger oder von Bestandteilen in den atherosklerotischen Läsionen herzustellen [Grayston et al. 1995, Kuo et al. 1997].

Einzuwenden bleibt jedoch, dass letztlich auch die Möglichkeit besteht, dass es sich von seiten der Mikroorganismen lediglich um die Rolle eines sog. „innocent bystander(s)“ [Ross et al. 1993] handelt, d.h. dass der menschliche Organismus zwar Kontakt mit dem betreffenden Erreger hatte - sichtbar an einem positiven

Antikörperbefund oder dem Nachweis des Erregers in den atherosklerotischen Plaques, dass der Mikroorganismus selbst jedoch keinen Beitrag zum Progress der Atherosklerose leistet, also einen „innocent bystander“ (sog. Epiphänomen) darstellt.

Dieser These widersprechen jedoch Tiermodelle, bei denen beispielsweise bei Kaninchen durch Infektion mit *C. pneumoniae* die Ausbildung atherosklerotischer Gefäßläsionen induziert werden konnte [Laitinen et al. 1997] und durch eine siebenwöchige Azithromyzin-Therapie eine geringere Ausprägung von atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu infizierten und zugleich nicht behandelten Kaninchen zu finden war [Muhlestein et al. 1998].

Einen weiteren Forschungsaspekt stellt - bei durch sehr zahlreiche Studien bisher nahezu sicher belegtem Einfluss der bekannten Risikofaktoren (s. o.) [Leinonen 2000] - die Rolle einer Infektion in diesem Zusammenhang dar. Hierbei stellt sich die Frage, inwieweit eine Infektion tatsächlich alleine auslösend für die Entwicklung der Atherosklerose ist, oder ob es zu einem Zusammenspiel bzw. einer wechselseitigen Verstärkung der „klassischen Risikofaktoren“ und einer Infektion kommt, was letztlich in therapeutischer Hinsicht bedeutete, dass eine alleinige antibiotische oder beispielsweise lipidsenkende, antihypertensive Therapie nicht zu einem ausreichenden Erfolg führen würde. Hierzu erschien beispielsweise 1999 eine Arbeit von Hu et al., die zeigen konnte, dass eine Infektion mit *C. pneumoniae* bei Mäusen, die einen LDL-Rezeptor-Defekt aufwiesen und mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, letztlich zur Exazerbation atherosklerotischer Läsionen führte [Hu et al. 1999]. Hinweise für solch ein Zusammenspiel von klassischen Risikofaktoren und einer Infektion mit *C. pneumoniae* liefern auch Murray et al., die eine Assoziation eines atherogenen Lipidprofils bei Männern und dem gleichzeitigen Vorliegen einer Seropositivität gegenüber *C. pneumoniae* fanden [Murray et al. 1999]. Ferner zeigten Leinonen et al. 1991, dass bei Patienten mit durch *C. pneumoniae* verursachten Pneumonien die HDL- und Triglyceridserumspiegel höher waren im Vergleich zu Patienten mit Pneumonien, welche viral oder durch andere Bakterien verursacht worden waren [Leinonen et al. 1991] (s. Kap. 7.6).

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem Zusammenhang einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose, insbesondere mit der Frage, inwieweit die sog. Hitze-Schock-Proteine (s. Kap. 7.4), v.a. das Hitze-Schock-Protein 60, ein mögliches Bindeglied zwischen einer solchen Infektion und der Initiation bzw. dem Progress der Atherosklerose darstellt.

7.2 Serologischer Nachweis einer Infektion durch *C. pneumoniae* und Koronare Herzkrankheit

Wie oben beschrieben besteht die Möglichkeit, einen eventuell gegebenen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit einem Mikroorganismus und der Pathogenese der Atherosklerose zu erkennen, indem man die Korrelation der Antikörperentwicklung gegen den entsprechenden Erreger und den gleichzeitigen Nachweis der Atherosklerose untersucht.

So wurde in dieser Studie an einem Patientenkollektiv von 752 Patienten, die einer Koronarangiographie unterzogen worden waren, untersucht, ob bei den Patienten, die nachweislich an einer Koronaren Herzkrankheit litten, häufiger positive oder auch höhertitrige Antikörperbefunde bezüglich *C. pneumoniae* vorlagen als bei Patienten, bei denen sich keine Koronare Herzkrankheit diagnostizieren ließ.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine signifikante Korrelation: Bei Patienten, die an einer Koronaren Herzkrankheit, d.h. einer Stenosierung der Koronarien von mindestens 50 % litten, konnte mittels des für *C. pneumoniae* spezifischen Mikroimmunfluoreszenztests bei 292 (68 %) der Patienten ein positiver Antikörperbefund (IgG) hinsichtlich *C. pneumoniae* gefunden werden, wohingegen bei Patienten ohne Koronare Herzkrankheit lediglich 136 (52 %) Patienten eine Reaktion gegenüber *C. pneumoniae* zeigten ($p = 0,007$; s. Kap. 6.3). Somit konnte im Rahmen dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit und dem Vorliegen einer Immunantwort (IgG) gegen *C. pneumoniae* festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse anderer Untersuchungen.

Erstmals wurde ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* und der Atherosklerose 1988 von Saikku et al. gefunden, die bei 50 % von Patienten, die an einer Koronaren Herzkrankheit litten, erhöhte Antikörpertiter

gegen *C. pneumoniae* (IgG und IgA) fanden [Saikku et al. 1988]. Es schlossen sich zahlreiche Studien an. Thom et al. beschrieben 1991 ebenfalls eine deutliche Assoziation zwischen einem positiven Antikörperbefund gegen *C. pneumoniae* und der Erkrankung an einer angiographisch nachgewiesenen Koronaren Herzkrankheit (d.h. wenigstens einer Gefäßstenose von 50 % / odds ratio: 2,6), wobei in dieser Studie – im Gegensatz zu der vorliegenden - der Zusammenhang lediglich für Raucher mit nachgewiesener Koronarer Herzkrankheit belegt werden konnte [Thom et al. 1991]. Die Veröffentlichungen von Saikku et al. beschrieben 1992 und 1993 erneut einen Zusammenhang zwischen einer Koronaren Herzkrankheit und einer Infektion mit *C. pneumoniae*. So konnte in der Studie von 1992 bei Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit, die in der sog. „Helsinki Heart Study“ (randomisierte, doppelblind durchgeführte Studie, die über 5 Jahre Gemfibrozil und dessen Effekt zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos untersuchte) eingeschlossen waren, innerhalb des beobachteten Zeitraumes ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten IgA-Antikörpertitern ($>1:64$) und der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen im Bereich der Koronarien gefunden werden ($p = 0,007$ - unter Einbezug klassischer Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie etc.), wohingegen die Ergebnisse bezüglich IgG ($>1:128$) - im Gegensatz zu der vorliegenden Studie - zwar in der an Koronarer Herzkrankheit erkrankten Gruppe erhöht waren, jedoch keine statistische Signifikanz erreichten (unter Einbezug klassischer Risikofaktoren) [Saikku et al. 1992]. In der 1993 durch die Arbeitsgruppe von Saikku veröffentlichten Studie konnte dann bei insgesamt 46 Patienten, die an einer Koronaren Herzkrankheit litten, bei 41 % eine Assoziation mit zirkulierenden Antikörpern, die chlamydiales Lipopolysaccharid enthielten, detektiert werden. In der entsprechenden Kontrollgruppe waren Immunkomplexe lediglich in 15 % gefunden worden [Linnanmäki et al. 1993]. Eine jüngere Studie stellt die von Ciervo et al. erschienene dar: Hier wurde eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorliegen von Antikörpern (IgG) gegen *C. pneumoniae* und der Erkrankung an einer Atherosklerose der Koronarien gefunden. Ein erhöhter Titer war in dieser Studie zudem mit dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (Kontrollgruppe mit 100 % der Patienten mit Antikörper-Titern $< 1:64$ bei insgesamt 70 % $\leq 1:32$, Patienten- / Verumgruppe mit 53 % und Titern $< 1:64$) verbunden [Ciervo et al. 2002], was im Rahmen der

hiesigen Studie nicht bewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte ein solcher Zusammenhang in Verbindung mit anderen Manifestationsformen der Atherosklerose gefunden werden: So zeigten Melnick et al. in der bereits oben erwähnten Studie, dass bei 326 Patienten mit nachgewiesener Karotisstenose deutlich mehr Patienten Antikörper (IgG) gegen *C. pneumoniae* (73 % vs. 63 %) hatten als die entsprechende Kontrollgruppe [Melnick et al. 1993].

Hinsichtlich serologischer Analysen bezüglich Immunglobulinen der Klasse M ließ sich in der vorliegenden Studie feststellen, dass - nach Rheumafaktor-Absorption - diese in keiner der analysierten Serumproben nachweisbar waren und somit keine Korrelation mit einer Koronaren Herzkrankheit hergestellt werden konnte. Dieses Ergebnis einer geringen Prävalenz von Immunglobulinen der Klasse M zeigte sich auch in anderen bisher erschienenen Studien. So fanden Maass et al. ebenso - nach Absorption der Rheumafaktoren - sowohl bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (n = 412) als auch bei Patienten ohne angiographisch nachgewiesener Koronarer Herzkrankheit (n = 431) eine nur geringe Anzahl an Seren mit positivem Antikörper-Befund (IgM, 2 % bzw. 0,2 % waren positiv) [Maass et al. 1996].

Ebenso berichten Melnick et al. bei Patienten mit asymptomatischen Stenosen der Aa. carotides von weniger als in 1 % der analysierten Seren nachweisbaren IgM [Melnick et al. 1993]. Ciervo et al. fanden darüber hinaus - wie auch die vorliegende Studie - keine Immunglobuline der Klasse M gegen *C. pneumoniae* [Ciervo et al. 2002]. Betrachtet man diesbezüglich den bei Wang et al. beschriebenen Titerverlauf von Immunglobulinen der Klasse M bei Patienten mit akuten respiratorischen Infektionen durch *C. pneumoniae*, so zeigt sich dort ein initial hoher Titer von IgM, der jedoch im Verlauf abnimmt und nach maximal ca. 110 Tagen nicht mehr nachweisbar ist, stattdessen sind Immunglobuline der Klasse G nachweisbar [Wang et al. 2000]. Dies wiederum spricht dafür, dass im Rahmen der Patientenkollektive akute Infektionen selten waren und demgegenüber chronische Infektionen häufiger, was für eine mögliche Assoziation einer chronischen oder Re-Infektion durch *C. pneumoniae*, nicht jedoch einer akuten Infektion und der Entwicklung der Atherosklerose sprechen könnte. Dies bestätigen Aussagen von Grayston et al., die Infektionen durch *C. pneumoniae* bei Erwachsenen als Reinfektionen mit Veränderungen im

Bereich der Antikörperantwort von IgG und IgA, nicht jedoch von IgM beschreiben [Grayston et al. 1989]. Einschränkend sei allerdings erwähnt, dass zum Ausschluss einer akuten Infektion die Analyse zweier, zeitlich versetzt (Abstand von 4-6 Wochen) gewonnener Serumproben notwendig ist [Wong et al. 1999].

Da jedoch auch bereits der Nachweis akuter Infektionen ohne einen entsprechenden Antikörpernachweis gelang [Chirgwin et al. 1991], sind die Kriterien, die eine Differenzierung akuter, chronischer und Re- Infektionen durch *C. pneumoniae* ermöglichen, bisher noch nicht eindeutig festlegbar.

Bei Betrachtung aller dieser Ergebnisse, einschließlich der hiesigen, scheint ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose möglich.

Doch ebenso wie die zahlreichen - oben aufgeführten - Studien, die eine positive Korrelation zeigen konnten, wurden weitere durchgeführt, die von keinerlei Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit und einem positiven Antikörperbefund gegenüber *C. pneumoniae* berichten und damit im Widerspruch zu den Ergebnissen auch der vorliegenden Studie stehen.

So konnten Danesh et al. 1999 keine deutliche Assoziation zwischen dem Vorliegen von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* (IgG) und einer Koronaren Herzkrankheit finden [Danesh et al. 1999]. IgG-Antikörper gegen *C. pneumoniae* lagen bei 33 % der Patienten mit atherosklerotischen Läsionen der Koronarien vor und ebenso bei 33 % der Patienten ohne Koronare Herzkrankheit. Ähnliches ließ sich für *Helicobacter pylori* (54 % vs. 46 %) und für das *Cytomegalievirus* (40 % vs. 31 %) feststellen. Eine weitere prospektive Studie von Ridker et al. untersuchte an einem recht großen Patientenkollektiv (je 343 Patienten der Verum- und Placebogruppe), ob ein Zusammenhang zwischen dem Ereignis eines Myokardinfarktes im Beobachtungszeitraum von 12 Jahren und dem jeweils messbaren Antikörpertiter (IgG, positiv bei > 1:16) festzustellen war, wobei die Risikofaktoren Rauchen und Alter in der Patienten- und Kontrollgruppe gleich verteilt waren. Bei Patienten, die zur Kontrollgruppe gehörten, bestand kein Anhalt für kardiovaskuläre Erkrankungen über einen Zeitraum von 12 Jahren. Hier konnte keine Korrelation zwischen dem Ereignis

eines Myokardinfarktes und einem zuvor erhöhten Antikörper-Titer gegen *C. pneumoniae* festgestellt werden [Ridker et al. 1999].

Auch bezüglich anderer Manifestationsformen der Atherosklerose existieren Veröffentlichungen, so wie beispielsweise die von Markus et al., die von keinerlei Korrelation berichten. Hier fand man bei Patienten mit duplexsonographisch diagnostizierten atherosklerotischen Plaques oder einer Stenose der A. carotis interna oder externa keine signifikante Korrelation zwischen einem solchen Befund und positiven IgG bzw. IgA-Titern gegen *C. pneumoniae* [Markus et al. 1999].

Wie dem Vorangegangenen zu entnehmen, divergieren die Ergebnisse seroepidemiologischer Studien, die sich mit dem möglichen Zusammenhang einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose beschäftigen, derzeit stark, und es bleibt zu diskutieren, woher diese Unterschiede kommen.

Ein häufiger Unterschied zwischen den verschiedenen Studien und zugleich ein Einflussfaktor ist die verschiedene Größe der Patientenkollektive:

Während bei Saikku et al. (1992) 103 Patienten (und 103 Kontrollen), bei Thom et al. (1991) 171 Patienten in die Studie eingeschlossen waren, so befanden sich in der hiesigen Studie 752 Patienten, von denen 489 unter einer koronarangiographisch nachgewiesenen Koronaren Herzkrankheit litten und 263 Kontrollen. Dieser Aspekt des großen zur Verfügung stehenden Patientenkollektivs hat sicherlich zur Erzielung repräsentativer Werte beigetragen und stützt so eine These der Korrelation einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose.

Weiterhin stellt die jeweilige Untersuchungsmethode und deren Sensitivität und Spezifität, mit Hilfe derer beispielsweise Patienten als an einer Atherosklerose der Koronarien erkrankt eingestuft wurden, einen wesentlichen Aspekt im Vergleich der Studien dar:

So sei die Studie von Danesh et al., die keine signifikante Korrelation zeigte, angeführt, in deren Rahmen es sich um Patienten handelte, die aufgrund klinischer Merkmale (z. B. Angina pectoris in der Anamnese) sowie dem Ereignis eines akuten Myokardinfarktes in das Patientenkollektiv aufgenommen wurden [Danesh et al. 1999]. In der hiesigen Studie wurde der Nachweis einer Koronaren Herzkrankheit jedoch mittels einer Koronarangiographie aller

Patienten erbracht. Im Rahmen der Studie von Thom et al. waren nicht alle Patienten einer Koronarangiographie unterzogen worden [Thom et al. 1991], so dass auch hier Patienten mit Koronarer Herzkrankheit möglicherweise aufgrund klinischer Beschwerdefreiheit letztlich fälschlicherweise in die Kontrollgruppe eingereiht wurden.

Der vorliegenden Studie stand also ein großes Patientenkollektiv mit sicher nachgewiesener oder letztlich ausgeschlossener Koronarer Herzkrankheit zur Verfügung, so dass eine verlässliche Einschätzung über das Vorliegen atherosklerotischer Läsionen der Koronarien ermöglicht wurde und im Vergleich mit anderen Studien sicher einen Vorteil darstellte.

Allerdings muss dahingegen eingewendet werden, dass *alle* Patienten einer Koronarangiographie unterzogen worden waren, so dass es sich bei diesen Patienten um eine bereits sehr selektierte Patientengruppe handelte. Einflüsse dieser Selektion auf die detektierten Zusammenhänge können daher nicht sicher ausgeschlossen werden.

Im allgemeinen - für alle erwähnten Studien geltend - muss ferner diskutiert werden, inwieweit die bekannt hohe Durchseuchungsrate ($> 50\%$, s.o.) von Infektionen mit *C. pneumoniae* in der Normalbevölkerung die Ergebnisse im Sinne eines falsch-positiven Fehlers bei Studien, die eine positive Korrelation (einschließlich der vorliegenden) beschreiben, möglicherweise beeinträchtigt haben.

Ferner muss bedacht werden, dass ein vorhandener positiver oder negativer Antikörperbefund nicht sicher zwischen einer vorangegangenen oder chronischen Infektion unterscheidet. Denn nach einer akuten Infektion mit *C. pneumoniae* kommt es Monate bis Jahre später häufig zu einem Abfall der Titer [Patnode et al. 1990, Wang 2000], so dass ein Antikörpernachweis möglicherweise trotz abgelaufener Infektion nicht mehr sicher gelingt und somit der Nachweis einer Korrelation ebenso nicht mehr gelingen kann. Sollte dies jedoch in gleicher Weise im Falle der an Koronarer Herzkrankheit erkrankten Patienten und der Kontrollgruppe geschehen, so müsste unter Einbezug dieses „systematischen Fehlers“ wiederum der Zusammenhang weiterhin nachweisbar sein.

Ein zu diskutierender Nachteil der vorliegenden Studie ist darüber hinaus, dass lediglich eine einzelne Serumprobe jedes Patienten gewonnen wurde und somit

Antikörpertiterschwankungen durch Reinfektionen oder Reaktivierungen nicht beobachtet werden konnten.

Ferner muss bezüglich des Aspektes eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Höhe des Antikörper-Titers und der Schwere der Erkrankung an einer Atherosklerose, wie bei Ciervo et al. beschrieben, diskutiert werden, inwieweit die erhöhten Antikörpertiter Ausdruck einer besonders schweren, vorangegangenen Infektion mit *C. pneumoniae* sind, oder aber ob sie in Abhängigkeit von der Immunitätslage als Charakteristika des Patienten zu betrachten sind [Ciervo et al. 2002].

Im Rahmen der Untersuchungen ist auch zu überdenken, inwieweit Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse, die *C. pneumoniae* und Atherosklerose betreffen, auch im Bereich der verwendeten Labormethoden zu suchen sind.

Ein Nachteil der serologischen Untersuchungen und deren Interpretation ist sicherlich, dass bisher lediglich ein *C. pneumoniae* spezifischer Antikörpertest zur Verfügung steht, der Mikroimmunfluoreszenztest [Kuo 1995]. Er ist derzeit Methode der Wahl, ist in der Anwendung jedoch aufwendig und erfordert technisches Geschick sowie Erfahrung in der Beurteilung [Peeling et al. 2000]. Er ist weiterhin nicht standardisiert (u. U. wurden unterschiedliche Inkubationszeiten, Temperaturen, Antigene, fluoreszenzmarkierte Antikörper sowie Mikroskope verwendet, und schließlich sind zum Ablesen stets verschiedene Untersucher tätig, was zu einer subjektiven Ergebnisbeurteilung führt) und weist so von Labor zu Labor zum Teil deutliche Unterschiede auf [Peeling et al. 2000]. In der Studie von Peeling et al. wurden gerade diese Unterschiede zwischen verschiedenen Laboratorien untersucht. Es fand sich eine Gesamtübereinstimmung von 80 %, auch wenn die absoluten Werte der Antikörpertiter von Labor zu Labor stark schwankten. Die Übereinstimmung bezüglich der IgM-Titer betrug bei Peeling et al. 50-95 %. Die größte Übereinstimmung zeigten die vierfach erhöhten IgG-Titer, die geringste die negativen bzw. niedrigen IgG-Titer. Doch gerade im Bereich dieser häufigen, niedrigen Titerstufen entscheidet sich das Vorliegen eines positiven oder negativen Antikörperbefundes. Dieser Aspekt sowie die häufig unterschiedlich festgelegten Titer, ab deren ein Ergebnis als positiv gewertet wurde - in der hiesigen Studie ab 1:16, wie auch bei Grayston et al. 1990 und Campbell et al.

1990 (s.u.) empfohlen, während beispielsweise bei Saikku et al. 1988 oder Ciervo et al. 2002 ein Titer von 1:32 als positiv eingestuft wurde - könnten weiterhin die unterschiedlichen Studienergebnisse bewirkt haben und einen Vergleich erschweren, so dass die Frage nach einer Korrelation weiter unbeantwortet bleibt.

Trotz allem bleibt der MIF der derzeit sensitivste und spezifischste Test zur Diagnostik von Infektionen mit *C. pneumoniae* [Wang 2000], und so wurde er auch im Rahmen der vorliegenden Studie als Referenzmethode verwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bisherigen Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer serologisch nachgewiesenen Infektion mit *C. pneumoniae* und dem gleichzeitigen Nachweis einer Atherosklerose beschreiben, sehr divergieren: Neben Studien, die eine deutliche Korrelation zeigen, existieren ebenso Studien, die das genaue Gegenteil belegen. Diese Unterschiede könnten u.a. in bisher nicht standardisierten Labormethoden, den unterschiedlichen Ausgangscharakteristika der Patientenkollektive oder aber in bisher Unbekanntem zu suchen sein, so dass ein Vergleich erschwert ist und einheitliche, eindeutige Schlussfolgerungen zum derzeitigen Zeitpunkt nicht möglich sind. Festzuhalten bleibt jedoch, dass das Erbringen eines die Ätiologie betreffenden *kausalen* Zusammenhanges mittels eines alleinigen Antikörpernachweises in jedem Falle im Rahmen der oben aufgeführten Studien - einschließlich der vorliegenden - nicht möglich war.

Es konnten lediglich Hinweise auf mögliche Zusammenhänge erhalten und diese beschrieben werden, wobei diese letztlich durch weitere, bestenfalls prospektive Studien oder Tiermodelle, weiter analysiert werden müssen.

7.3 Immunoblotanalyse und Koronare Herzkrankheit

In der vorliegenden Studie wurde ferner mittels der Western Blot-Technik die Reaktion der verschiedenen Patientenserum gegenüber chlamydialem Antigen untersucht (s. Kap. 6.5). Ziel dieses Teiles der Studie war es zu untersuchen, ob bei Patienten, bei denen eine Koronare Herzkrankheit vorlag, sich eine spezifische Reaktion gegenüber chlamydialen Proteinen zeigte, d.h. ob letztlich ein bestimmtes Reaktionsbandenmuster mit dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit korrelierte.

Insgesamt fand sich in allen 348 im Immunoblot-Verfahren untersuchten Seren, unabhängig davon, ob eine Koronare Herzkrankheit vorlag oder nicht, eine große Variationsbreite der detektierten Proteinbanden. Es zeigten sich in allen Patientengruppen Reaktionen im Bereich von Proteinen mit Molekulargewichten im Bereich von 17 bis 100 kDa (s. Kap. 6.5). Von einer ähnlich großen Streubreite berichten Puolakkainen et al., die Reaktionen im Bereich von 30 bis 98 kDa, unabhängig von dem Vorliegen eines respiratorischen Infektes oder einer Koronaren Herzkrankheit beobachteten [Puolakkainen et al. 1993]. Eine von Iijima et al. veröffentlichte Studie untersuchte ebenso die Reaktionsbandenmuster im Immunoblot bei *C. pneumoniae* - allerdings ohne einen Zusammenhang mit der Erkrankung an einer Koronaren Herzkrankheit herzustellen [Iijima et al. 1994]. Hier fand sich ein von den beiden anderen *Chlamydia spp.* (*C. psittaci*, *C. trachomatis*) verschiedenes Reaktionsbandenmuster und ebenso wie in den beiden zuvor erwähnten Studien ein breites Bandenspektrum. Reaktionsbanden im Bereich der Proteingrößen 53, 46, 43, 40 (Major Outer Membrane Protein) kDa und einer eher schwachen Reaktion im Bereich von 118, 116, 100, 98, 57, 51 und 37 kDa waren feststellbar.

Darüber hinaus fanden Campbell et al. 1990 bei mit *C. pneumoniae* nachgewiesener Infektion Reaktionsbanden im Bereich von 98, 68, 60, 39,5 und 30 kDa [Campbell et al. 1990] und Freidank et al. erbrachten den Nachweis von Reaktionsbanden im Bereich von 26 - 125 kDa [Freidank et al. 1993].

In der vorliegenden Studie zeigte sich zudem, dass Reaktionsbanden im Proteingrößenbereich von 62, 60, 58, 40 und 17 kDa häufiger zu detektieren waren als Proteine anderer Molekulargewichte. Allerdings ließ sich hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen mit und ohne

Koronarer Herzkrankheit feststellen, d.h. dass die Häufigkeit der Proteinbanden mit den Größen 62, 60, 58, 40 und 17 kDa in allen beiden Gruppen eine gleiche Verteilung fand (beispielsweise hinsichtlich des 62 kDa-Proteins: 13 % ohne KHK vs. 16 % mit KHK, $p = 0,365$). Somit konnte kein spezifisches Reaktionsbandenmuster, das für das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit sprach, beobachtet werden.

In der bereits erwähnten Studie von Puolakkainen et al. 1993 wurden zum einen Patienten mit einer mittels Histopathologie postmortem nachgewiesenen Atherosklerose und zum anderen Patienten mit einer akuten respiratorischen Infektion mit *C. pneumoniae* untersucht. Die Gruppe der Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit wurde weiterhin in eine Gruppe mit Nachweis von *C. pneumoniae* und in eine Gruppe ohne Nachweis von *C. pneumoniae* in den atherosklerotischen Läsionen unterteilt. Im Vergleich zu der Gruppe mit akuten respiratorischen Infektionen fanden Puolakkainen et al. häufiger eine Reaktion mit Proteinen im Bereich von 42 und 52 kDa bei Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit - unabhängig vom Nachweis von *C. pneumoniae* in den untersuchten atherosklerotischen Läsionen [Puolakkainen et al. 1993]. Somit stellt sich, basierend auf der Studie von Puolakkainen et al., die Frage, inwieweit die Proteine im Bereich von 42 und 52 kDa mögliche „Markerproteine“ für eine chronische Infektion oder möglicherweise für eine mit einer chronischen *C. pneumoniae*-Infektion assoziierte Form der Atherosklerose sind.

In dieser Studie konnte, wie bereits oben erwähnt, eine solche Dominanz bestimmter Reaktionsbanden bei Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit nicht gefunden werden.

Eine ferner bei Campbell et al. vorbeschriebene, für *C. pneumoniae* spezifische Reaktionsbande im Bereich von 98 kDa oder 54 kDa war in dieser ebenso wie in der durch Puolakkainen et al. erstellten Studie nicht vermehrt zu finden [Campbell et al. 1990, Puolakkainen et al. 1993], wobei allerdings Freidank et al. eine Reaktionsbande im Bereich von 54 kDa (und zugleich 45 kDa) ebenfalls als für *C. pneumoniae* spezifisch beschreiben [Freidank et al. 1993]. Ein Zusammenhang zur Erkrankung an einer Koronaren Herzkrankheit wird allerdings in den Studien von Campbell et al. und Freidank et al. nicht hergestellt. In der Untersuchung von Freidank et al. handelte es sich um zur einen Hälfte gesunde und zur anderen Hälfte an respiratorischen Infekten

erkrankte Patienten (n = 248) [Freidank et al. 1993]. Campbell et al. schlossen Patienten mit einer durch Mikroimmunfluoreszenztest, Komplementfixation oder durch Isolation nachgewiesene Infektion mit *C. pneumoniae* bei z.T. gleichzeitig vorhandener Infektion mit *C. trachomatis* oder *C. psittaci* oder aber Seronegativität bezüglich aller drei *Chlamydia spp.* in die Studie mit ein [Campbell et al. 1990].

Den vier (Puolakkainen, Campbell, Freidank, vorliegende Studie) erwähnten Untersuchungen gemeinsam ist eine im Immunoblot häufiger festgestellte Reaktionsbande im Bereich von 60 kDa. Während bei Campbell und Freidank et al. kein Vergleich bezüglich einer Erkrankung an einer Koronaren Herzkrankheit erfolgte, wurde bei Puolakkainen et al. 1993 diese als eine vor allem im Zuge akuter respiratorischer Infektionen (nicht jedoch mit einer Koinzidenz einer Koronaren Herzkrankheit einhergehende) reagierende Reaktionsbande beobachtet: 80 % der Patienten mit einer akuten respiratorischen Infektion (n = 10) und lediglich 43 % (n = 23) mit atherosklerotischen Läsionen ohne Nachweis von *C. pneumoniae* sowie 23 % (n = 22) mit *C. pneumoniae*-Nachweis zeigten eine Reaktionsbande im Bereich von 60 kDa. Wenn auch bei Freidank et al. kein Vergleich mit an einer Koronaren Herzkrankheit erkrankten Patienten erfolgte, so konnte auch hier ein vermehrtes Auftreten der Reaktionsbande im Größenbereich von 60 kDa bei Patienten mit im Mikroimmunfluoreszenztest nachgewiesener Infektion mit *C. pneumoniae* (IgG und IgA) gefunden werden [Freidank et al. 1993]. In der vorliegenden Studie wiederum konnte bezüglich der Häufigkeit einer Reaktionsbande bei 60 kDa kein Unterschied bei Patienten mit und ohne Koronare Herzkrankheit festgestellt werden. Somit kann aufgrund dieser Ergebnisse diskutiert werden, ob die Proteine im Größenbereich von 42, 52 und 60 kDa tatsächlich Marker für das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit bzw. einer akuten Infektion sind.

Beim Vergleich der Studien muss noch einmal betont werden, dass die Patientengruppen der Studien unterschiedlich waren. Hinsichtlich der Studie von Campbell et al. sei ferner erwähnt, dass es sich um ein sehr kleines Patientenkollektiv handelte (n = 26), so dass ein repräsentatives Ergebnis hier letztlich fraglich bleibt [Campbell et al. 1990].

Darüber hinaus wurde in den bereits beschriebenen Studien die Rolle des „Major Outer Membrane Protein(s)“ (MOMP) als immundominantem Protein untersucht, und hierbei konnten ebenso unterschiedliche Ergebnisse gefunden werden. Wie bereits oben erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie ein vermehrtes Auftreten einer Reaktionsbande im Bereich von 40 kDa (Proteingrößenbereich des MOMP) gefunden, was für eine grundsätzlich vorhandene Immundominanz des MOMP (unabhängig vom Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit) sprechen könnte. Bei Campbell et al. fand sich - bei allerdings, wie schon erwähnt, recht kleinem Patientenkollektiv - wie auch bei Freidank et al. keine Immundominanz des MOMP [Campbell et al. 1990, Freidank et al. 1993]. Zudem konnten Puolakkainen et al. ebenso keine vermehrte Häufigkeit einer Reaktionsbande im Bereich der dem MOMP entsprechenden Proteingröße von 40 kDa detektieren [Puolakkainen et al. 1993]. Demgegenüber beschrieben Iijima et al. das MOMP als deutlich immundominant bei jedoch zugleich beschriebener häufiger Involvierung im Rahmen von Kreuzreaktionen mit *C. trachomatis* und *C. psittaci* und somit möglicherweise falsch positivem Ergebnis diesbezüglich [Iijima et al. 1994].

In der hiesigen Studie wurde darüber hinaus auch der Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer Proteinbande im Bereich von 40kDa, d.h. im Größenbereich des MOMP und der Höhe des entsprechenden Antikörpertiters betrachtet. Diese Analyse diente - neben dem im Immunoblot häufigeren Nachweis einer Reaktionsbande im Bereich von 40 kDa (s.o.) - ebenso zur Einschätzung einer möglichen Immundominanz des MOMP im Rahmen serologischer Reaktionen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit dem Nachweis von Antikörpern gegen das Major Outer Membrane Protein im Western Blot-Verfahren im Vergleich zur entsprechenden Gruppe ohne Nachweis von Antikörpern gegen das MOMP keinesfalls höhere Antikörpertiter (IgG) im Mikroimmunfluoreszenztest vorlagen (65 % vs. 68 %). Diese Befunde sprechen - trotz des häufigeren Nachweises der Reaktionsbande im Bereich von 40kDa - eher nicht für eine Immundominanz des Major Outer Membrane Protein(s), gerade auch unter Betrachtung des durch Kutlin et al. beschriebenen Aspektes, dass Proteine, die an der Oberfläche von *C. pneumoniae* lokalisiert sind, die zur Antigen-Antikörperreaktion zur Verfügung stehende Proteine sind [Kutlin et al. 1998; s.u.]. Demgegenüber beschreiben Freidank et al. eine im allgemeinen

vorhandene Korrelation von erhöhten Antikörper-Titern im Mikroimmunfluoreszenztest und gleichzeitigem Vorhandensein von vermehrten und deutlicher ausgeprägten Reaktionsbanden im Immunoblot [Freidank et al. 1993].

Aufgrund all dieser unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich einer Immundominanz des Major Outer Membrane Protein(s), lässt sich eine eindeutige Aussage diesbezüglich zur Zeit nicht treffen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die gesamten bisherigen Forschungen bezüglich bestimmter Reaktionsbanden und somit Reaktion mit bestimmten Proteinen von *C. pneumoniae* im Immunoblot divergierende Ergebnisse liefern, so dass sich eine einheitliche Aussage derzeit nur schwer formulieren lässt. Erklärungen für diese divergierenden Resultate könnten folgende sein:

Sicherlich spielt - ebenso wie bereits zuvor für den Mikroimmunfluoreszenztest beschrieben - die Durchführung und Auswertung des Immunoblot-Verfahrens eine Rolle. Hier ist ein aufwendiger Ablauf von Arbeitsschritten notwendig, so dass sich eine Reihe von Einflussmöglichkeiten ergibt, deren Ausmaß nicht genau abzuschätzen ist, die aber zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben könnte. Als ein Beispiel hierfür sei das Ablesen des Immunoblots erwähnt. Hier wird (s. Kap. 5.6.5) mittels eines Markers mit bekannten Proteingrößen durch entsprechendes Übertragen der Reaktionsbandenlaufweite das Ablesen der Proteingrößen, im Bereich derer durch ein getestetes Serum Reaktionsbanden entstanden sind, möglich. Hierbei können durch Ungenauigkeiten der Ausmessungen und enges Aufeinanderfolgen der Reaktionsbanden die Proteingrößen nicht korrekt bestimmt werden.

Einen weiteren Aspekt stellt ferner das jeweils verwendete Antigen dar: Ähnlich wie andere Bakterienarten scheinen auch bei *C. pneumoniae* unterschiedliche Serovare zu existieren [Wagels et al. 1994, Jantos et al. 1997]. Wagels et al. und Jantos et al. zeigten mittels Immunoblot sowie DNA-Analyse mittels PCR, dass verschiedene *C. pneumoniae*-Isolate eine unterschiedliche serologische Reaktion boten [Wagels et al. 1994, Jantos et al. 1997]. Somit wurde ein Hinweis für die mögliche Existenz verschiedener Serovare erbracht. Dies bedeutete natürlich, dass der Vergleich der Ergebnisse der Studien, die eine serologische Reaktion von *C. pneumoniae* hinsichtlich eines beispielsweise für eine Koronare

Herzkrankheit sprechenden Reaktionsbandenmusters untersuchten, nur eingeschränkt möglich ist. Denn so könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch auf die Antikörper-Bildung gegenüber dem Antigen verschiedener Serovare zurückzuführen sein. Ähnliches zeigen auch Black et al., die ebenso Hinweise für die Existenz unterschiedlicher Serotypen von *C. pneumoniae* fanden [Black et al. 1991]. Demgegenüber berichten Iijima et al. jedoch von einer gleichbleibenden Reaktion eines einzigen Serums gegenüber sieben verschiedenen *C. pneumoniae*-Isolaten, was wiederum für eine sehr ähnliche Antigenität dieser Arten spricht, und somit keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede darstellt [Iijima et al. 1994].

Letztlich kommen auch Kreuzreaktionen mit den beiden anderen *Chlamydia spp.* in Frage, die zu der Beeinflussung der Reaktionsbandenmuster geführt haben könnten. So berichten Freidank et al. dies bei Reaktionsbanden im Bereich von 49-, 54-, 60-, 65-, und 68- kDa: Hier reagierten *C. trachomatis*-positive Seren mit den entsprechenden Banden von *C. pneumoniae* im Immunoblot [Freidank et al. 1993]. Iijima et al. beschreiben ferner, dass es bezüglich der Proteine mit einem Molekulargewicht von 73 und 40 kDa häufig zu einer Kreuzreaktion im Immunoblot kommt [Iijima et al. 1994].

Auch im Falle der vorliegenden Studie wurde eine Reaktionsbande, die dem Major Outer Membrane Protein (40 kDa) zugeordnet werden konnte, häufiger beobachtet (s.o.). Kreuzreaktionen sind auch im Falle der vorliegenden Studie nicht auszuschließen, zumal die zuvor im Mikroimmunfluoreszenztest getesteten Seren lediglich gegen *C. pneumoniae*, nicht jedoch zugleich gegen das Antigen von *C. trachomatis* und *C. psittaci* ausgetestet wurden. Dies wiederum schränkt auch die durch diese Studie erhaltenen und oben erwähnten Aussagen einer möglichen Immundominanz des Major Outer Membrane Protein(s) ein.

Über den Aspekt der Kreuzreaktion hinaus muss erwähnt werden, dass Studienergebnisse existieren, die ein häufiges Auftreten von falsch-negativen Mikroimmunfluoreszenztests zeigen. Denn wie Kutlin et al. beschreiben, belegt ein negativer Mikroimmunfluoreszenztest keinesfalls, dass keine Antikörper gegenüber *C. pneumoniae* vorhanden sind. So schildern Kutlin et al., dass bei 80 % untersuchter Patientenseren mit negativem Mikroimmunfluoreszenztest (bei positivem Kulturergebnis) der entsprechende Immunoblot eine positive Reaktion gegenüber chlamydialen Proteinen zeigte [Kutlin et al. 1998]. Der

Grund hierfür könne darin bestehen, dass im Rahmen des Mikroimmunfluoreszenztestes die Reaktion gegenüber kompletten - d.h. nicht nach Proteinen aufgetrennten - *C. pneumoniae*-Bakterien getestet wird. Somit stellen im Falle dieses serologischen Testverfahrens wohl vor allem die an der Oberfläche der Bakterien lokalisierten Proteine die zur Antigen-Antikörperreaktion zur Verfügung stehenden Antigene dar, wie beispielsweise das Major Outer Membrane Protein. Zusätzlich bestehe hier jedoch auch die Möglichkeit, dass die Anzahl dieser an der Oberfläche befindlichen, reaktionsfähigen Proteine durch die Präparation mit Azeton im Zuge des Mikroimmunfluoreszenztestes reduziert wird [Kutlin et al. 1998].

Zusammenfassend lässt sich ähnlich wie bereits zuvor für die Ergebnisse, die mittels Mikroimmunfluoreszenztest erhalten wurden, festhalten, dass bislang keine einheitliche Meinung bezüglich eines möglichen Zusammenhanges einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose besteht - sieht man von dem einheitlich beschriebenen Aspekt der Reaktionsbandenvielfalt ab. Ähnlich wie im Rahmen des Mikroimmunfluoreszenztestes könnten mögliche Ursachen im Bereich der Charakteristika der Patientenkollektive und der Labormethoden zu suchen sein. So sind auch hier weitere Studien notwendig, in denen mit standardisierten Methoden gearbeitet werden sollte.

Allerdings muss auch bezüglich der serologischen Untersuchungen mittels Immunoblot festgehalten werden, dass das Erbringen eines *kausalen* Zusammenhanges hierbei nicht möglich ist; es können lediglich statistische Korrelationen gefunden und beschrieben werden, wobei dies wiederum das Vorliegen eines kausalen Zusammenhanges letztlich ebenso nicht ausschließt. Betrachtet man jedoch die widersprüchlichen Forschungsergebnisse, so bleibt eine Korrelation einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose weiter fraglich.

7.4 Hitze-Schock-Protein 60 – Verbindungsglied zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherosklerose ?

Wesentlicher Schwerpunkt der vorliegenden Studie war die Frage, ob es eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Serumantikörpern gegen das Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* und einer Koronaren Herzkrankheit gibt. Eine positive Korrelation könnte als Hinweis für eine Beteiligung des Hitze-Schock-Protein 60 an der Pathogenese der Atherosklerose gewertet werden.

Hitze- Schock- Proteine sind in der Natur weitverbreitete Proteine, denen sowohl im menschlichen Organismus als auch im Mikroorganismus eine entscheidende Rolle im Rahmen von Stressreaktionen [Zügel et al. 1999] zukommt. Im Zuge solcher Situationen metabolischen (Toxine, Zytokine, O₂-Radikale, pH-Wertänderungen) oder umweltbedingten Stresses (Hitze), wird die Produktion der Hitze-Schock-Proteine sowohl im Wirts- als auch im entsprechenden Mikroorganismus gesteigert, während sie normalerweise nur in geringer Konzentration im Zytoplasma und den Mitochondrien vorhanden sind [Zügel et al. 1999]. Sie haben dann die Aufgabe, als molekulare Chaperone zu wirken, d.h. sie bewirken zum einen die Faltung und den Transport neu synthetisierter Proteine im geschädigten Organismus und zum anderen haben sie eine Aufgabe im Rahmen der Beseitigung bereits denaturierter Proteine [Kaufmann 1990]. Hierbei stellt die Präsenz denaturierter Proteine den Auslöser für eine vermehrte Produktion von Hitze-Schock-Proteinen im Sinne einer positiven Rückkopplung dar [Kaufmann 1990]. Damit kommt dieser Proteingruppe eine entscheidende Bedeutung bei Schutz- und Reparaturmechanismen im Organismus zu. Ferner wird vermutet, dass Hitze-Schock-Proteine weiterhin eine Rolle im Rahmen der Antigen-Präsentation spielen [Kaufmann 1990].

Die Gruppe der Hitze-Schock-Proteine, die bis zum derzeitigen Kenntnisstand etwa zwei Dutzend Proteine einschließt, wird aufgrund der jeweiligen Molekulargewichte der Proteine in kDa eingeteilt. So kennt man Proteine mit den Größen von 60 kDa (sog. Hitze-Schock-Protein 60), 70 kDa (Hitze-Schock-Protein 70), 90 kDa (Hitze-Schock-Protein 90) und eine weitere Anzahl von Proteinen mit kleineren Molekulargewichten [Xu et al. 1996].

Ein Charakteristikum, das hinsichtlich eines kausalen Zusammenhanges der Hitze-Schock-Proteine und der Atherosklerose wichtig zu sein scheint, ist, dass diese Proteine ubiquitär vorhanden sind, eine große genetische Stabilität aufweisen, und dass sich darüber hinaus eine über 50 %-ige Sequenzhomologie der Hitze-Schock-Proteine innerhalb menschlicher, pflanzlicher, tierischer und auch bakterieller Organismen findet [Kaufmann 1990]. Beispielsweise zeigt das menschliche Hitze-Schock-Protein 65 eine 65 %-ige Sequenzhomologie zu dem entsprechenden Hitze-Schock-Protein des *Mycobacterium(s) tuberculosis* [Zügel et al. 1999]: Mindestens vier Regionen (mit einer Länge von mehr als zehn Aminosäuren) zeigen teilweise eine nahezu identische und teilweise eine völlig identische Sequenz. Aufgrund dieser Eigenschaft ist eine Immunreaktion in Form einer Kreuzreaktion zwischen Hitze-Schock-Proteinen verschiedener Spezies denkbar. Im Falle einer Infektion könnte dies bedeuten, dass im Rahmen der immunologischen Abwehrreaktion des menschlichen Organismus Antikörper bzw. T-Zellen gebildet werden, die ursprünglich gegen das pathogene Agens gerichtet waren, dann jedoch den eigenen Organismus schädigen (Autoimmunreaktion). Eine Präsentation der entsprechenden, zumeist intrazellulär vorliegenden Hitze-Schock-Proteine auf der Zelloberfläche, scheint durch MHC-Moleküle gewährleistet zu sein. So konnte für bestimmte Wirtszellen nachgewiesen werden, dass diese bei Stresssituationen Hitze-Schock-Proteine auf ihrer Zelloberfläche präsentieren [Kaufmann 1990].

Im Falle des bereits erwähnten Hitze-Schock-Proteins 65 von *Mycobacterium tuberculosis* wurde beispielsweise durch Munk et al. eine T-Zell-Immunantwort auf Epitope synthetischer Peptide nachgewiesen, die sowohl bei *M. tuberculosis* als auch im menschlichen Organismus vorhanden sind [Munk et al. 1989]. Hiermit konnte formal gezeigt werden, dass auch im gesunden Organismus T-Zell-Linien vorhanden sind, die gegen autologes Hitze-Schock-Protein 65 gerichtet sind. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass T-Zellen, die gegen autologes Hitze-Schock-Protein 65 gerichtet sind, der klonalen Deletion während der Reifung im Thymus entgehen, da sie nicht in ausreichend großer Dichte im menschlichen Organismus produziert werden. Möglicherweise sind sie jedoch in vielen Individuen in geringer Anzahl „latent“ vorhanden, und es wurde gezeigt, dass es - sollte eine Infektion (o.ä. Formen von Stress) hervorgerufen werden - durch die homologen mikrobiellen Antigene zu

einer Aktivierung der bereits existenten T-Zell-Klone kam. Dies wiederum könnte die Präsentation der autologen Hitze-Schock-Protein 65-Antigene - z.T. unter Zuhilfenahme der MHC-Moleküle - durch die entsprechenden, „gestressten“ Zellen induzieren [Kaufmann 1990]. Somit wären Voraussetzungen, die eine Autoimmunantwort ermöglichen, geschaffen.

Erkrankungen, im Rahmen derer eine Beteiligung der Hitze-Schock-Proteine bisher festgestellt werden konnte, sind die Rheumatoide Arthritis (Hitze-Schock-Protein 65), die ankylosierende Spondylitis (Hitze-Schock-Protein 70) und der systemische Lupus erythematoses (Hitze-Schock-Protein 90) [Zügel et al. 1999]. Beispielhaft soll kurz auf die Rheumatoide Arthritis und deren Zusammenhang mit Hitze-Schock-Proteinen - in diesem Falle dem mykobakteriellen Hitze-Schock-Protein 65 - eingegangen werden, da hierfür bisher am eindeutigsten ein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte:

Forschungen ergaben, dass im Tierversuch (bei Ratten) die Erkrankung an Rheumatoider Arthritis durch komplettes Freund's Adjuvanz - eine Lösung, die reich an Hitze-Schock-Proteinen ist - induziert werden konnte [Kaufmann 1990]. Eine weitere Beobachtung spricht ebenfalls für eine Beteiligung des Hitze-Schock-Proteins 65 im Rahmen der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis. So konnte gezeigt werden, dass zwischen humanem und mykobakteriellem Hitze-Schock-Protein 65 kreuzreagierende, monoklonale Antikörper existieren, die jedoch lediglich in humanem Probenmaterial nachzuweisen waren, das durch Rheumatoide Arthritis befallen war. Gesundes Material ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Hitze-Schock-Protein 65 [Kaufmann 1990].

Solche autoimmunologischen Vorgänge werden allerdings nicht nur für die Rheumatoide Arthritis und die beiden oben erwähnten Erkrankungen der ankylosierenden Spondylitis und dem systemischen Lupus erythematoses diskutiert, sondern solche autoimmunologischen, durch Infektionen getriggerten, Mechanismen werden auch für die Entstehung der Atherosklerose als ursächlich in Betracht gezogen.

So konnten Xu et al. zeigen, dass bei Patienten mit atherosklerotisch veränderten Aa. carotides (sonographischer Nachweis) im Enzymimmunoassay signifikant erhöhte Antikörper-Titer gegenüber mykobakteriellem Hitze-Schock-Protein 65

vorhanden waren [Xu et al. 1993]. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1993 verwandten sie erneut die Patientenseren, die diese nachgewiesenen atherosklerotischen Läsionen der Karotiden und zugleich hohe Titer gegen mykobakterielles Hitze-Schock-Protein 65 aufwiesen. Hierbei zeigten die isolierten Antikörper (IgG) im Immunoblot eine Reaktion gegenüber einem Protein aus atherosklerotischen Läsionen im Bereich von 60 kDa. Xu et al. vermuteten, dass es sich hierbei um humanes Hitze-Schock-Protein 60 handelt, was vermehrt in Endothelzellen und Makrophagen der Läsionen produziert wird, denn es wurde im Western Blot-Verfahren bei diesen Seren zugleich eine Reaktion gegenüber rekombinantem, humanem Hitze-Schock-Protein 60 nachgewiesen [Xu et al. 1993].

Hoppichler et al. erbrachten weitere Hinweise für die mögliche Involvierung von mykobakteriellem Hitze-Schock-Protein 65 in die Pathogenese der Atherosklerose: Bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit stellten sie fest, dass diese im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Antikörper-Titer gegenüber Hitze-Schock-Protein 65 von *Mycobacterium tuberculosis* aufwiesen ($p = 0,029$) [Hoppichler et al. 1996].

Da sich die vorliegende Studie speziell mit einer Infektion durch *C. pneumoniae* und deren Mitwirken bei der Entwicklung der Atherosklerose beschäftigt hat, stellt sich zunächst die Frage, weshalb gerade bezüglich *C. pneumoniae* und der Atherogenese ebenso eine Beteiligung von Hitze-Schock-Proteinen für möglich gehalten wird.

Hier sei zunächst erwähnt, dass für andere *Chlamydia spp.*, vorwiegend für *C. trachomatis*, bekannt ist, dass das Hitze-Schock-Protein 60 eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese solcher Infektionen zu spielen scheint [Brunham et al. 1994].

Im Falle von *C. trachomatis* wird - ähnlich wie zuvor für das Hitze-Schock-Protein 65 von *Mycobacterium tuberculosis* - die Ursache dieses Zusammenhanges vor allem in der großen Sequenzhomologie des humanen und des chlamydialen Hitze-Schock-Proteins 60 gesehen [Cerrone et al. 1991].

So kann es - analog dem zuvor für die Rheumatoide Arthritis Aufgezeigten - zu einer Kreuzreaktion kommen, die zur Folge hat, dass sich Antikörper bzw. T-Zellen, die ursprünglich zur Wirkung gegen chlamydiales Antigen gebildet

wurden, dann gegen autologes Antigen richten [Domeika et al. 1998]. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion durch das körpereigene Immunsystem provoziert, welche letztlich zu einer entsprechenden Schädigung führt, wie es beispielsweise auch im Falle einer Infektion mit *C. trachomatis* zu einer Schleimhautentzündung im Bereich der Tuben mit nachfolgender Stenosierung kommt [Toye et al. 1993]. Gerade im Falle solcher Infektionen mit *C. trachomatis*, welche oftmals asymptomatisch und somit unbehandelt verlaufen, besteht die Möglichkeit von persistierenden bzw. rekurrenden Infektionen, so dass eine rezidivierende Stimulation auf das Immunsystem und somit ein Fortschreiten der pathogenetischen Vorgänge, u.a. auch die Produktion von Hitze-Schock-Proteinen in Phasen klinisch manifester Erkrankung, hervorgerufen werden kann [Domeika et al. 1998].

Darüber hinaus zeigten Toye et al., dass Antikörper gegen das Hitze-Schock-Protein 60 von *C. trachomatis* signifikant häufiger bei Patientinnen mit tubarer Infertilität im Vergleich zu Patientinnen mit anderen Ursachen einer Infertilität bzw. bei schwangeren Patientinnen zu finden waren ($p < 0,001$). Zudem lag im Falle einer Seropositivität gegenüber *C. trachomatis* und dem Vorliegen einer tubaren Infertilität zu 81,3 % ein positiver Antikörperbefund gegen Hitze-Schock-Protein 60 vor, wohingegen keine der Frauen mit anderer Ursache einer Infertilität sowie 16,4 % der schwangeren Frauen einen positiven Antikörperbefund gegenüber chlamydialem Hitze-Schock-Protein 60 aufwiesen [Toye et al. 1993]. Hierdurch konnte im Rahmen dieser Studien offensichtlich ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem positiven Antikörperbefund gegenüber Hitze-Schock-Protein 60 und der Entwicklung einer tubaren Infertilität auf dem Boden einer *C. trachomatis*-Infektion gezeigt werden.

Abschließend seien zu dem Aspekt, inwiefern das Hitze-Schock-Protein 60 im Rahmen von Infektionen mit *C. trachomatis* involviert sein könnte bzw. ist, noch die Studien von Peeling et al. 1998 sowie Eckert et al. 1997 erwähnt, welche im Falle von Peeling et al. eine Korrelation zwischen der Erkrankung an einem Trachom und einem positiven Antikörperbefund bezüglich Hitze-Schock-Protein 60 fanden: Während 32 % der erkrankten Patienten Antikörper gegen das Hitze-Schock-Protein 60 aufwiesen, ließen sich im Falle gesunder Patienten nur 16 % detektieren, die Antikörper gegen das Hitze-Schock-Protein 60 hatten, wobei

dies jeweils unabhängig von dem im Mikroimmunfluoreszenztest festgestellten IgG-Titer gegen *C. trachomatis* war ($p < 0,001$) [Peeling et al. 1998].

Eckert et al. zeigten, dass ein positiver Antikörper-Befund gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 sowohl mit Risikofaktoren für eine Salpingitis, mit manifester Salpingitis sowie mit Tubenverschluss assoziiert war ($p < 0,001$) [Eckert et al. 1997]. Ein interessanter Aspekt dieser Studie ist ferner, dass diese Korrelation nur für die Erkrankungen nachgewiesen werden konnte, die chronische Infektionen mit *C. trachomatis* darstellten, während im Falle akuter Infektionen mit *C. trachomatis* das Hitze-Schock-Protein 60 keine Rolle spielte [Eckert et al. 1997]. Insgesamt scheint gerade im Rahmen chronisch persistenter Infektionen das Hitze-Schock-Protein 60 von wichtiger Bedeutung zu sein, denn Beatty et al. zeigten, dass gerade in diesen Fällen die Exprimierung von Hitze-Schock-Protein 60 deutlich vermehrt und die anderer chlamydialer Proteine vermindert ist [Beatty et al. 1994].

Aufgrund dieser Studien, die teilweise sehr deutlich zeigen konnten, dass das Hitze-Schock-Protein 60 in die Pathogenese von Infektionen mit *C. trachomatis* involviert zu sein scheint, stellt sich die Frage, inwieweit diese Zusammenhänge auch für andere Chlamydienpezies, insbesondere *C. pneumoniae*, zutreffen und inwieweit dies im Falle der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielt.

Es existieren einige Studien - wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben - die eine grundsätzliche Beteiligung von *C. pneumoniae* im Rahmen der Atherosklerose möglich erscheinen lassen. Im Falle einer tatsächlichen Beteiligung von *C. pneumoniae* an der Pathogenese der Atherosklerose könnte also - in Analogie zu anderen Infektionen mit Chlamydien - das Hitze-Schock-Protein 60 das Verbindungsglied zwischen der Infektion und der Atherosklerose darstellen.

In der vorliegenden Studie wurden die Seren der Patienten, bei denen sich ein positiver Antikörperbefund gegen *C. pneumoniae* zeigte, mittels eines Enzymimmunoassays hinsichtlich Antikörpern gegenüber Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* untersucht. Im Anschluss daran wurden die Seren mit positivem Ergebnis, also mit dem Nachweis von Antikörpern gegen das chlamydiale Hitze-Schock-Protein 60 im Enzymimmunoassay (EIA) einer

weiteren Analyse mittels Western Blot-Technik unter Verwendung des gleichen Antigens zugeführt. Hierbei zeigte sich (bei Bestätigung von 87 % der im Enzymimmunoassay als positiv bewerteten Seren) kein Zusammenhang zwischen einem positiven Enzymimmunoassay-Ergebnis bzw. dem Vorhandensein einer Reaktionsbande im Immunoblot (gegenüber chlamydialem Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae*) und der Erkrankung der Patienten an einer Koronaren Herzkrankheit. Vielmehr ließ sich sogar in der Kontrollgruppe eine höhere Prävalenz von HSP-Antikörpern (im EIA: 67 % vs. 33 %; s. Kap. 6.4) finden. Darüber hinaus war es nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Antikörper-Titers und dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit aufzudecken. ($p = 0,143$; s. Kap. 6.4).

Es kann also in der vorliegenden Studie keine signifikante Korrelation zwischen einem positiven Antikörperbefund (sowohl im Enzymimmunoassay als auch im Western Blot) gegenüber Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* und dem Vorliegen einer Atherosklerose der Koronarien mit Stenosen $> 50\%$ gezeigt werden, was die These der Rolle des Hitze-Schock-Proteins 60 als Verbindungsglied einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Erkrankung an der Atherosklerose zu widerlegen scheint.

Diese Resultate stehen im Kontrast zu denen der Studie von Ciervo et al., die im ELISA bei 99,1 % einer Patientengruppe mit nachgewiesener Koronarer Herzkrankheit ($n = 219$) und bei 0 % einer Patientengruppe ohne Nachweis atherosklerotischer Läsionen ($n = 100$) Antikörper (IgG) gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 fanden [Ciervo et al. 2002].

Beide Studien zeigten jedoch gleichermaßen eine hohe Spezifität des ELISA, denn die dort erhaltenen Ergebnisse ließen sich bei Ciervo et al. vollständig im Immunoblot bestätigen. In der hiesigen Studie ließ sich ebenso eine hohe - wenn auch nicht vollständige - Übereinstimmung der Ergebnisse der Immunoblots und der Enzymimmunoassays finden. 125 der 143 (87 %) im EIA als positiv gegenüber Hitze-Schock-Protein 60 getesteten Seren bestätigten sich im Immunoblot (s. Kap. 6.4).

Ein Nachweis von Immunglobulinen der Klasse M oder A, die gegen das Hitze-Schock-Protein 60 gerichtet waren, gelang ferner bei Ciervo et al. nicht. In der vorliegenden Studie ist eine Analyse diesbezüglich nicht durchgeführt worden.

Ein weiterer Aspekt der Studie von Ciervo et al. war der häufig positive Antikörperbefund (IgG) gegen das Hitze-Schock-Protein 60 im ELISA bei gleichzeitig negativem MIF-Ergebnis [Ciervo et al. 2002]. Diskutiert wird dieses Ergebnis bei Ciervo et al. vor allem im Rahmen der hohen Kreuzreaktivität innerhalb der Familie der Hitze-Schock-Proteine, so dass in der vorliegenden Studie einige der Seren aufgrund dieses Pathomechanismus im MIF möglicherweise falsch positiv eingestuft worden waren.

Im Hinblick auf die vorliegende Studie bedeutet dies weiterhin, dass es durch die initial durchgeführte Untersuchung aller Seren im Mikroimmunfluoreszenztest und durch eine weitere Testung der dort als positiv gegenüber *C. pneumoniae* getesteten Seren zu einer Vorauswahl kam. Dies könnte dazu geführt haben, dass kein die Gesamtheit repräsentierendes Patientenkollektiv (sowohl mit als auch ohne Koronare Herzkrankheit) im Rahmen der Untersuchung hinsichtlich von Antigen-Antikörperreaktionen bezüglich des Hitze-Schock-Proteins 60 verwendet wurde.

Dies bedeutet, dass letztlich ein verlässliches Ergebnis hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit einer Koronaren Herzkrankheit nicht erreicht werden konnte – allerdings war dies auch bei Ciervo et al. aufgrund der geschilderten möglicherweise wirksamen Kreuzreaktionen nicht der Fall. Denn in beiden Studien könnten diese Kreuzreaktionen zu einem „systematischen Fehler“ geführt und somit Korrelationen verdeckt haben. Hier wären weitere Studien notwendig, die solche Kreuzreaktionen ausschließen und somit eine verlässlichere Aussage hinsichtlich einer Korrelation ermöglichen.

Vergleichend sei eine weitere Studie von Olaimatu et al. aus dem Jahr 2002 aufgeführt. Hier fand sich ähnlich zu den zuvor beschriebenen Forschungen von Ciervo und Xu et al. 1993 und im Gegensatz zu der hiesigen Studie eine erhöhte Prävalenz von Antikörpern (IgG) gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit [Olaimatu et al. 2002]. Ein besonderer Aspekt dieser Studie von Olaimatu et al. stellt die gleichzeitige Testung der Seren auch gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 10, vollständige *C. pneumoniae*-Bakterien als Antigen, E.coli Hitze-Schock-Protein 60 und 10 sowie gegen humanes Hitze-Schock-Protein 60 und 10 dar. Hierbei konnte unter Einbezug klassischer Risikofaktoren lediglich für chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 eine unabhängige Korrelation mit der Erkrankung an

einer Koronaren Herzkrankheit nachgewiesen werden ($p = 0,006$). Dieses Ergebnis spricht - so Olaimatu et al. - dafür, dass eine Verbindung zwischen der Erkrankung an einer Koronaren Herzkrankheit und einer Infektion durch Chlamydien und deren Hitze-Schock-Protein 60 besteht. [Olaimatu et al. 2002]. Keine der bisher erschienenen Studien - einschließlich der vorliegenden - hat bisher diesen Aspekt so ausgedehnt betrachtet und Untersuchungen hinsichtlich Reaktionen verschiedener Hitze-Schock-Proteine durchgeführt. Einschränkend muss jedoch bezüglich des Ergebnisses der Studie von Olaimatu et al. erwähnt werden, dass es sich bei dem verwendeten chlamydialen Hitze-Schock-Protein 60 nicht um von *C. pneumoniae*, sondern von *C. trachomatis* stammendes Antigen handelte. Somit sind - auch wenn eine 92 %-ige Sequenzhomologie der beiden Hitze-Schock-Proteine (von *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*) besteht [Olaimatu et al. 2002] - Aussagen hinsichtlich der Korrelation einer Koronaren Herzkrankheit mit einer *C. pneumoniae*-Infektion und ein verlässlicher Vergleich mit der hiesigen Studie letztlich nicht möglich.

Eine weitere - prospektive - Studie von Huittinen et al. erbrachte ein Ergebnis, das die vorliegende Studie zum Teil bestätigte [Huittinen et al. 2002].

Es wurde untersucht, ob ein erhöhter IgG- oder IgA-Titer gegenüber *C. pneumoniae* sowie ein erhöhter Antikörper-Titer gegenüber humanem Hitze-Schock-Protein 60 und Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* ein Risikofaktor für die Entwicklung eines tödlich oder nicht-tödlich verlaufenden Myokardinfarktes ist.

Während sich - wie auch in der hiesigen Studie - bezüglich der ermittelten IgG-Titer kein Unterschied (auch hinsichtlich der gegen Hitze-Schock-Protein gerichteten IgG) bei Patienten mit bzw. ohne koronar-ischämisches Ereignis fand, so zeigte sich jedoch bei Huittinen et al. bei Patienten mit einem solchen Ereignis im Verlauf ein deutlich erhöhter Titer von IgA gegen *C. pneumoniae* ($p = 0,024$) und Ig A, die gegen *humanes* Hitze-Schock-Protein 60 gerichtet waren ($p = 0,04$). Hierbei bestand eine signifikante Korrelation zwischen IgA gegen *humanes* Hitze-Schock-Protein 60 und *zugleich* vorhandenen IgA gegenüber *chlamydialem* Hitze-Schock-Protein 60 ($p < 0,001$). So war die Konstellation einer Infektion mit *C. pneumoniae* (gemessen an vorhandenen IgA gegen *C. pneumoniae*) sowie das gleichzeitige Vorhandensein von Antikörpern (IgA gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60) ein deutlicher Risikofaktor

für die Entwicklung der Atherosklerose. Eine isolierte Korrelation des erhöhten Antikörper-Titers gegen Hitze-Schock-Protein 60 von *C. pneumoniae* und dem Auftreten eines ischämischen Ereignisses konnte allerdings nicht detektiert werden [Huittinen et al. 2002]. Eine Analyse hinsichtlich des Vorhandenseins von Immunglobulinen der Klasse A war in der hiesigen Studie nicht durchgeführt worden, so dass ein Vergleich diesbezüglich nicht möglich ist. Ein wesentlicher Unterschied zur zuvor erwähnten Studie von Olaimatu et al. ist jedoch der bei Huittinen et al. eindeutig beschriebene Pathomechanismus einer autoimmunologischen Reaktion als Grundlage eines Zusammenhanges einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Entwicklung einer Koronaren Herzkrankheit, denn bei Olaimatu et al. war das genaue Gegenteil beschrieben worden (s.o.).

Ein darüber hinaus im Rahmen der Studie von Huittinen et al. betrachteter Aspekt war der Nachweis von erhöhten Spiegeln des Entzündungsparameters „C-reaktives Protein“ (CRP) und zugleich vermehrt nachweisbaren Antikörpern gegen humanes Hitze-Schock-Protein 60: So war bei niedrigem CRP-Spiegel und zugleich erhöhtem Antikörperspiegel (IgA) gegen humanes Hitze-Schock-Protein 60 kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko feststellbar. Ein erhöhter CRP-Spiegel in Kombination mit einem erhöhten IgA-Titer gegen (humanes) Hitze-Schock-Protein 60 stellte jedoch eine Konstellation dar, die zur Erhöhung des Risikos um das Zweifache im Vergleich zu den Patienten mit einer niedrigen Konzentration an IgA (gegen humanes Hitze-Schock-Protein) führte. Insgesamt war ein erhöhter CRP-Spiegel sogar der Risikofaktor allererster Ordnung [Huittinen et al. 2002].

Eine Studie, die ebenfalls eine Beeinträchtigung des CRP-Spiegels in die Analyse hinsichtlich einer Immunreaktion gegen Hitze-Schock-Protein 60 einbezog, war die von Fong et al. 2002 veröffentlichte [Fong et al. 2002]: Hier wurde zum einen bei Patienten mit Stenosen der Aa. carotides, die einer Thrombendatherektomie zugeführt wurden, ein Nachweis von *C. pneumoniae* in den Plaques geführt. Zum anderen wurde eine Analyse hinsichtlich gegebenenfalls vorhandener Antikörper gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 angefertigt. Es zeigte sich bei 70,4 % der Patienten mit in den Plaques nachweisbarem Bakterium *C. pneumoniae* ein erhöhter Antikörper-Titer (gemessen am Wert für die optische Dichte im Enzymimmunoassay) im

Vergleich zu 23,8 % der Patienten ohne *C. pneumoniae* innerhalb der atherosklerotischen Plaques, die ebenfalls einen erhöhten Antikörpertiter (IgG gegen chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60) aufwiesen ($p < 0,001$). Bezüglich des Spiegels des C-reaktiven-Proteins konnte jedoch - gegensätzlich zur zuvor erwähnten Studie von Huittinen et al. - keinerlei Korrelation zwischen dem Nachweis von *C. pneumoniae* in den atherosklerotischen Plaques und einem erhöhten Antikörperspiegel detektiert werden ($p = 0,556$) [Fong et al. 2002].

Eine Analyse des Spiegels des C-reaktiven Proteins war in der vorliegenden Studie nicht einbezogen worden. Die weiteren Ergebnisse (hinsichtlich gegen Hitze-Schock-Protein 60 gerichteter Antikörper) der hiesigen und der Studie von Fong et al. stellten sich unterschiedlich dar. Da der Aufbau der Studien deutlich differierte, ist jedoch ein Vergleich nur eingeschränkt möglich. Handelte es sich bei Fong et al. um Patienten mit Stenosen der Aa. carotides, so wurden in der hiesigen Studie Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen der Koronarien eingeschlossen. War in der Studie von Fong et al. der Nachweis von *C. pneumoniae* immunhistochemisch geführt worden, so diente in der hiesigen Studie der Mikroimmunfluoreszenztest zum Nachweis einer Infektion mit *C. pneumoniae*. Dies kann - betrachtet man weitere Ergebnisse von Fong et al. - zu einer deutlich unterschiedlichen Zusammenstellung der zu testenden Patientengruppen geführt haben: Denn Fong et al. zeigten auch, dass nur eine minimale Korrelation zwischen dem Ergebnis eines Mikroimmunfluoreszenztestes und dem entsprechend gelungenen oder nicht gelungenen immunhistochemischen Nachweis von *C. pneumoniae* in den atherosklerotischen Läsionen bestand ($p = 0,94$).

Eine Studie von Biasucci et al. [Biasucci et al. 2003] erbrachte ferner ein sehr eindrückliches Ergebnis: Hier wurden Patienten mit Akutem Koronarsyndrom, mit stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt hinsichtlich Antikörpern (IgG) bzgl. *Chlamydia pneumoniae* sowie hinsichtlich HSP-60 von *Chlamydia pneumoniae* untersucht. Zusätzlich wurden bei diesen Patienten auch das sog. „hochsensitive C-reaktive Protein“ und das Troponin T bestimmt. Es konnte hierbei ein deutlicher Zusammenhang eines positiven Antikörperbefundes bzgl. HSP-60 von *C. pneumoniae* und dem Akuten Koronarsyndrom gefunden werden: Bei 99 % aller Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom waren IgG gegen HSP-60 nachweisbar, wohingegen

dies nur bei 20 % der Patienten mit stabiler Angina pectoris und bei keinem der Patienten in der Kontrollgruppe der Fall war [Biasucci et al. 2003].

Um diese Betrachtungen zu ergänzen, sei noch eine nicht auf dem Ansatz des Nachweises einer Antigen-Antikörperreaktion basierende Studie von Kol et al. 1998 erwähnt: Sie zeigte, dass sowohl humanes als auch chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 (89 % bzw. 47 % der durch Atherosklerose befallenen Proben) in atherosklerotischen Plaques, nicht jedoch in nicht-pathologisch veränderten Gefäßen nachzuweisen war, wobei in 77 % der untersuchten Proben beide Arten von Hitze-Schock-Protein nachweisbar waren. Innerhalb dieser Plaques war es ferner beiden Arten von Hitze-Schock-Protein 60 möglich, die Produktion von E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 im Endothel zu induzieren und über die Aktivierung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten/Makrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF- α oder Metalloproteinasen zu induzieren [Pockley et al. 2002]. Zugleich könnte dies wiederum zu einer vermehrten Expression von Hitze-Schock-Proteinen durch die vermehrte Ausschüttung der Zytokine wie INF- γ , IL führen [Hansson et al. 1996]. Somit wird ein Mechanismus denkbar, mit Hilfe dessen eine kontinuierliche Progression (vermehrte Plaqueinstabilität) der Atherosklerose, und zwar durch eine chronische *C. pneumoniae*-Infektion und damit einhergehende Entzündungsvorgänge stattfinden könnte - ähnlich wie bereits oben unter anderem für Infektionen mit *C. trachomatis* beschrieben. Ein weiterer Aspekt bei Betrachtung dieses inflammatorischen Geschehens ist, dass man bezüglich der - oben bereits besprochenen - Rheumatoiden Arthritis feststellen konnte, dass im Tiermodell die Reaktion gegen körpereigenes Hitze-Schock-Protein 60 im Vergleich zu fremdem Hitze-Schock-Protein 60 eher zur Produktion antiinflammatorisch wirksamer T-Zell-Linien führte, während eine Reaktion gegen fremdes Antigen eher eine inflammatorische Wirkung erzielte [Pockley 2002]. Möglicherweise könnte so auch im Rahmen der Atherosklerose eine Infektion, beispielsweise durch *C. pneumoniae*, zu einem Überwiegen der proinflammatorischen Komponente führen und damit ein vermehrtes Fortschreiten der Erkrankung induzieren. Dieses könnte dann möglicherweise auch mit dem durch Huittinen et al. beschriebenen erhöhten CRP-Spiegel als Risikofaktor größter Ordnung korrelieren [Huittinen et al. 2002].

Wie bei der Durchführung des Mikroimmunfluoreszenztestes und des Western Blot-Verfahrens bereits erwähnt, bestehen auch bei der Durchführung der Immunoblotanalyse bezüglich des Hitze-Schock-Proteins 60 im Rahmen der verschiedenen Studien einige methodische Unterschiede und ebenso Unterschiede in der Zusammenstellung des Patientenkollektivs. Dies könnte u.a. zu den - in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen - divergierenden Ergebnissen geführt haben.

So wurde in der vorliegenden Studie gereinigtes, rekombinantes Antigen verwendet, was einerseits das Ablesen beziehungsweise die Beurteilung der durchgeführten Western Blot-Untersuchungen vereinfachte und damit Ablese-/Beurteilungsfehler minimierte, andererseits jedoch auch die Möglichkeit einschloss, dass aufgrund der Denaturierung des Hitze-Schock-Proteins 60 (während des Vorgangs der Reinigung und Präparation als Antigen) bestimmte sehr spezifische Epitope (konformationelle Antigene) zerstört und somit nicht detektiert wurden. Hiermit waren eventuell bestehende Unterschiede, die gerade diese Antigene betrafen, bei Patienten mit und ohne Koronare Herzkrankheit schließlich nicht vollständig beurteilbar. Dies scheint bei Ciervo et al., die eine deutliche Korrelation zwischen einem positiven Antikörper-Titer von Immunglobulinen der Klasse G gegenüber chlamydialem Hitze-Schock-Protein 60 fanden, nicht der Fall gewesen zu sein. Sie verwendeten natives Hitze-Schock-Protein 60, welches zuvor keiner Denaturierung unterzogen worden war [Ciervo et al. 2002].

Ferner sollte hinsichtlich der vorliegenden Studie erwähnt werden, dass eine fehlende Korrelation zwischen *humoraler* Immunantwort und dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit letztlich kein endgültiger Beweis für einen nicht vorhandenen Zusammenhang ist. Denn ebenso besteht - wie oben bereits mehrfach erwähnt - die Möglichkeit, dass zwischen humanem und chlamydialem Hitze-Schock-Protein kreuzreagierende T-Zellen - also eine *zelluläre* Immunreaktion - für die pathologischen Vorgänge verantwortlich sind. Hier existieren Studien wie die von Emeson 1998 und Hansson 1989, die eine entscheidende Rolle von T-Zellen im Prozess der Atherosklerose zeigen [Emeson et al. 1988, Hansson et al. 1989]. So detektierten Hansson et al. 1991 ferner, dass es im Tiermodell bei Ratten nach der Elimination von T-Zellen mit

Hilfe monoklonaler Antikörper zu einer vermehrten Progression von atherosklerotischen Läsionen kam [Hansson et al. 1991].

Ein weiterer Aspekt ist die Konstellation des Patientenkollektivs. Hierbei sei zum einen die Größe angeführt, die in der hiesigen Studie mit 428 gegen Hitzeschock-Protein 60 getesteten Seren im ähnlichen Größenbereich wie bei Huittinen et al. ($n = 478$) und bei Olaimatu ($n = 500$) lag. Bei Ciervo et al. und bei Fong et al. wurde ein kleineres und somit ein weniger repräsentatives Ergebnis lieferndes Patientenkollektiv von 200 bzw. 75 Patienten verwendet [Ciervo et al. 2002, Fong et al. 2002]. Darüber hinaus waren die Charakteristika der Patientenkollektive unterschiedlich: So wurden in der hiesigen Studie diejenigen Patienten als an Koronarer Herzkrankheit erkrankt eingestuft, die im Rahmen der Koronarangiographie eine Stenose $\geq 50\%$ aufwiesen (Stenosen $< 50\%$ führten zur Einstufung als nicht an Koronarer Herzkrankheit erkrankt). Bei Olaimatu et al. führte erst eine Stenosierung von 70% zur Aufnahme in die Gruppe der an Koronarer Herzkrankheit Erkrankten, und nur Patienten mit Stenosen $< 10\%$ wurden bei Olaimatu et al. als Kontrollen eingeschlossen. Hieraus ergibt sich aufgrund der strengeren Einstufung möglicherweise eine validere Aussage hinsichtlich einer eventuell vorhandenen Korrelation mit der Erkrankung an Koronarer Herzkrankheit. Im Hinblick auf die Studie von Fong et al. sei wiederum erwähnt, dass hier zum einen Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen der Aa. carotides und nicht der Koronarien untersucht wurden, und dass zum anderen keine Kontrollgruppe ohne das Vorhandensein von atherosklerotischen Läsionen bei gleichzeitig kleinem Patientenkollektiv zur Verfügung stand. Somit ist ein Vergleich der Studien - wie bereits oben erwähnt - aufgrund der unterschiedlichen Ausgangscharakteristika erschwert und die Ergebnisse der hiesigen Studie wie auch der von Olaimatu et al. sind sicherlich aufgrund der vorhandenen Kontrollgruppe als mehr valide zu werten.

So bleibt auch bezüglich der Rolle der humoralen (oder zellulären) Immunantwort im Rahmen der Atherosklerose bisher noch vieles unklar, so dass weitere Studien notwendig sind. Mit Bezug auf die o.g. wie auch auf die hiesige Studie ist erneut zu betonen, dass letztlich eine vorhandene oder auch eben nicht vorhandene signifikante Korrelation zwischen einer Immunantwort (sei sie zellulär oder humoral) und dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit

niemals den Beweis eines *kausal*en Zusammenhanges erbringen kann, sondern lediglich Hinweise auf mögliche Zusammenhänge. So ist diese Studie als ein Baustein zu verstehen, der einen weiteren Hinweis in Bezug auf einen möglichen Zusammenhang der Atherosklerose und der Infektion mit *C. pneumoniae* erbracht hat, keinesfalls konnte hierdurch ein ätiologischer Zusammenhang sicher be- oder widerlegt werden.

7.5 Atherosklerose, Infektionen mit *C. pneumoniae* und klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren

Betrachtet man die o.g. Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *C. pneumoniae* und der Atherogenese herstellen, so stellt sich die Frage, inwieweit die bekannten und durch zahlreiche Forschungsergebnisse belegten [Ridker et al. 1997] klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie beispielsweise arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie oder auch Nikotinabusus (weiterhin) eine Rolle spielen.

Eine Studie von Murray et al. 1999 stellte einen Zusammenhang zwischen einer solchen Infektion (definiert über den Nachweis von im Mikroimmunfluoreszenztest nachgewiesenen IgG gegen *C. pneumoniae*) und dem Gesamt- bzw. HDL-Cholesterin-Spiegel und damit die Verbindung klassischer Risikofaktoren mit dem Aspekt eines infektiologischen Geschehens her [Murray et al. 1999]. Sie zeigte, dass bei Nachweis einer Infektion mit *C. pneumoniae* eine eher erniedrigte HDL-Cholesterin- und eine erhöhte Gesamtcholesterinkonzentration zu finden war ($p = < 0,05$ bzw. $p = < 0,01$) [Murray et al. 1999]. Andere klassische Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Nikotinabusus oder Adipositas zeigten hier keine Korrelation mit einer gleichzeitigen Infektion mit *C. pneumoniae*, was wiederum in anderen Studien belegt werden konnte. So beschreibt beispielsweise die Studie von Patel et al. eine solche Korrelation zwischen dem klassischen Risikofaktor Nikotinabusus und einer Infektion mit *C. pneumoniae* [Patel et al. 1995].

Geht man nun von einer Korrelation klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren und einer Infektion mit *C. pneumoniae* bei der Atherogenese aus, so stellt sich die Frage, inwieweit die beiden Faktoren im Rahmen der Pathogenese ineinander

greifen. Diesen Aspekt betreffend sei die Studie von Xu et al. 1992 erwähnt, die bei Kaninchen mit Normocholesterinämie durch Immunisation mit mykobakteriellem Hitze-Schock-Protein 65 die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen induzierte und eine positive Korrelation mit T-Zellen, die gegen Hitze-Schock-Protein 65 gerichtet waren, nachweisen konnte [Xu et al. 1992]. Zudem konnten Xu et al. ein vermehrtes Auftreten von atherosklerotischen Läsionen bei Kaninchen feststellen, denen eine cholesterinreiche Diät verabreicht und bei denen gleichzeitig eine Immunisation mit Hitze-Schock-Protein 65 durchgeführt wurde. Interessanterweise entstanden hierbei die atherosklerotischen Läsionen v.a. im Bereich von Gefäßen, die vermehrt hämodynamischem Stress ausgesetzt waren, wie beispielsweise im Aortenbogen. Denkbar wird somit ein Zusammenspiel von Schädigungen des Endothels durch die klassischen Risikofaktoren wie Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie etc. sowie einer vorangegangenen Initiation der Läsionen durch autoimmunologische Reaktionen. Dass hierbei das Vorhandensein der klassischen Risikofaktoren notwendig ist, zeigte eine weitere Studie von Xu et al. 1996. Hier wurden im Tiermodell bei Kaninchen atherosklerotische Läsionen durch Immunisierung mit komplettem Freund's Adjuvanz (mit hohem Gehalt an Hitze-Schock-Protein 65) induziert. Xu et al. fanden bei Kaninchen mit nicht erhöhtem Cholesterinspiegel eine Regression der atherosklerotischen Läsionen, während bei gleichzeitigem Vorliegen einer Hyperlipidämie diese Regression im Verlauf nicht zu verzeichnen war [Xu et al. 1996].

Neben Studien, die autoimmunologische Vorgänge als ursächlich für die Initiation der Atherosklerose beschreiben, existieren Thesen, die in den klassischen Risikofaktoren wiederum die *Ursache* einer vermehrten Expression von Hitze-Schock-Proteinen sehen. So bewirken diese (Hyperlipoproteinämie, Nikotin, Diabetes mellitus etc.) zum einen oxidativen Stress, welcher eine vermehrte Expression von Hitze-Schock-Proteinen durch glatte Muskelzellen veranlasst und zum anderen seien hämodynamische Faktoren wie arterielle Hypertonie dafür verantwortlich, dass durch vermehrten - hämodynamischen - Stress eine erhöhte Expression von Hitze-Schock-Proteinen sowie eine größere Neigung zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen besteht [Pockley 2002]. Hochleitner et al. zeigten dies mittels Kultur von Endothelzellen - hier kam es zur vermehrten Expression von Hitze-Schock-Proteinen durch mechanischen Stress [Hochleitner

et al. 2000]. Möglicher Pathomechanismus könnte sein, dass es durch diesen hämodynamischen Stress zu einer Dislokation im Bereich des Zytoskeletts sowie einer darauffolgenden Denaturierung von Proteinen kommt, was dann die vermehrte Ausschüttung von Hitze-Schock-Proteinen bewirkt [Xu et al. 1993].

Darüber hinaus beschrieben Kalayoglu et al., dass im Falle hoher Serumkonzentrationen von LDL-Cholesterin und einer chlamydialen Infektion von Makrophagen, den zentralen Mediatoren der inflammatorischen Prozesse im Rahmen der Atherosklerose, der Regulationsmechanismus, welcher normalerweise dafür sorgt, dass in Gegenwart von nativem LDL nur eine bestimmte Menge an LDL-Cholesterin intrazellulär aufgenommen wird, außer Kraft gesetzt ist. So könnte es intrazellulär (innerhalb der Makrophagen) zu einer Anreicherung großer Mengen an exogenen Lipiden kommen [Kalayoglu et al. 2000]. Eine weitere Studie von Kalayoglu et al. zeigte, dass es durch eine Infektion mit *C. pneumoniae* zur Förderung der Oxidation des LDL-Cholesterins durch Monozyten kommt, was für die Atherogenese wiederum einen entscheidenden Faktor darstellt; chlamydiales Hitze-Schock-Protein 60 scheint hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen [Kalayoglu et al. 2000].

Im Rahmen der vorliegenden Studie ist keine Analyse bezüglich der klassischen Risikofaktoren und einer möglichen Korrelation mit serologischen Merkmalen/Ergebnissen hinsichtlich einer Infektion mit *C. pneumoniae* durchgeführt worden.

In Anbetracht der beschriebenen Studienergebnisse scheint ein Zusammenspiel der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren mit einem infektiösen Geschehen, insbesondere auch durch *C. pneumoniae*, durchaus möglich.

Betrachtet man insgesamt die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit dem Nachweis einer Korrelation von IgG gegen *Chlamydia pneumoniae* und dem Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit, dann scheint die Möglichkeit, dass eine bakterielle Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* im Rahmen der Atherogenese eine wesentliche Rolle spielt, weiterhin möglich. Offensichtlich spielt hierbei das Hitze-Schock-Protein 60 jedoch keine wichtige Rolle - gelang doch der Nachweis einer Korrelation diesbezüglich nicht.

Weitere, vor allem prospektive Studien sind erforderlich, um einen möglichen Zusammenhang näher zu untersuchen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Ambrosetti QFE.** La reaccion de Frei en las endoarteritis obliterantes. Rev. Argentina Dermatosifil 1943; 27: 624-625.
- Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J et al..** Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary heart disease and serological evidence for *C. pneumoniae* infection. Circulation 1999; 99: 1540-1547.
- Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM et al..** Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. Science 1999; 283: 1335-1339.
- Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP.** Repeated and persistent infection with Chlamydia and the development of chronic inflammation and disease. Trends Microbiol. 1994; 2: 94-98.
- Benditt EP, Barett T, Mac Dougal JK.** Viruses in the etiology of atherosclerosis. Proc Natl. Acad. Sci. USA 1973; 70: 1753-1756.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Ciervo A et al..** Antibody response to Chlamydial Heat Shock Protein 60 Is Strongly Associated With Acute Coronary Syndromes. Circulation 2003; 107 (24): 3015-3017.
- Black CM, Johnson JE, Farshy CE et al..** Antigenic Variation among Strains of *Chlamydia pneumoniae*. J. Clin. Microbiology 1991; 29: 1312-1316.
- Black CM, Perez R.** *Chlamydia pneumoniae* multiplies within human pulmonary macrophages. Abstract, 90th Annual Meeting ASM, Washington DC; American Society of Microbiology, 1990, no D-1, p80.
- Braun J, Laitko S, Treharne J et al..** *Chlamydia pneumoniae* – a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Ann. Rheum. Dis. 1994; 53: 100-105.
- Brunham RC, Peeling RW.** Chlamydia trachomatis antigens: role in immunity and pathogenesis. Infect. Agents Dis. 1994; 3: 218-233.
- Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL et al..** Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in Human Coronary Atherectomy Tissues. J. Infect. Dis. 1995; 172: 585-588.
- Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT.** *Chlamydia pneumoniae* and Cardiovascular Disease. Emerging Infectious Diseases 1998; Vol. 4, Nr. 4.

- Campbell LA, Kuo C-C, Wang S-P et al..** Serological Response to *Chlamydia pneumoniae* Infection. J. Clin. Microbiology 1990; 28: 1261-1264.
- Cerrone MC, Ma JJ, Stephens RS.** Cloning and sequence of the gene for heat-shock protein 60 from *Chlamydia trachomatis* and immunological reactivity of the protein. Infect. Immun. 1991; 1991: 79-90.
- Chi EY, Kuo C-C, Grayston JT.** Unique ultrastructure in the elementary body of *Chlamydia* sp. strain TWAR. J. Bacteriol. 1987; 169:3757-3763.
- Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M et al..** Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn. J. Infect. Dis 1991; 163: 757-761.
- Chiu B, Viira E, Tucker W et al..** *Chlamydia pneumoniae*, Cytomegalovirus, and Herpes simplex Virus in Atherosclerosis of the Carotid Artery. Circulation 1997; 96: 2144-2148.
- Ciervo A, Visca P, Petrucca A et al..** Antibodies to 60-Kilodalton Heat Shock Protein and Outer Membrane Protein 2 of *C. pneumoniae* in Patients with Coronary Heart Disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002; 9: 66-74.
- Cines DB, Lyss AP, Bina M et al..** Fc and C3 receptors induced by herpes simplex virus on cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest. 1982; 69: 123-128.
- Coutts WE, Davila M.** Lymphogranuloma venereum as a possible cause of arteriosclerosis and other arterial conditions. J. Trop. Med. Hyg. 1945; 48: 46-51.
- Danesh J, Wong Y, Ward M et al..** Chronic infection with *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, or cytomegalovirus: population based study of coronary heart disease. Heart 1999; 81:245-247.
- Domeika M, Domeika K, Paavonen J et al..** Humoral Immune Response to Conserved Epitopes of *Chlamydia trachomatis* and Human 60 kDa Heat-Shock Protein in Women with Pelvic Inflammatory Disease. J. Infect. Dis. 1998; 177: 714-719.
- Eckert LO, Hawes SE, Wolner et al..** Prevalence and Correlates of Antibody to Chlamydial Heat Shock Protein in Women Attending Sexually Transmitted Disease Clinics and Women with Confirmed Pelvic Inflammatory Disease. J. Infect. Dis. 1997; 175: 1453-1458.
- Emeson EE, Robertson AL.** T lymphocytes in aortic and coronary intimas: their potential role in atherogenesis. Am. J. Pathol. 1988; 130: 369-376.

- Erntell M, Ljunggren K, Gadd T et al..** Erythema nodosum – a manifestation of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection. Scand. J. Infect. Dis. 1989; 21 693-696.
- Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM et al..** Virus induced atherosclerosis. J. Exp. Med. 1978; 148: 335-340.
- Fong IW, Chiu B, Viira E et al..** Rabbit Model for *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin. Microbiol. 1997; 35: 48-52.
- Fong IW, Chiu B, Viira E et al..** Chlamydial Heat-Shock Protein 60 Antibody and Correlation with *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerotic Plaques. J. Infect. Dis. 2002; 186: 1469-1473.
- Freidank HM, Herr AS, Jacobs E.** Identification of *Chlamydia pneumoniae*-Specific Protein Antigens in Immunoblots. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12: 947-951.
- Godzik KL, O'Brien ER, Wang S-K et al..** In Vitro Susceptibility of Human Vascular Wall Cells to Infection with *Chlamydia pneumoniae*. J. Clin. Microbiology 1995; 33: 2411-2414.
- Grayston JT.** Infections caused by *C. pneumoniae* strain TWAR. Clin. Infect. Dis. 1992; 15 757-763.
- Grayston JT.** Does *Chlamydia pneumoniae* cause Atherosclerosis ? Arch. Surg. 1999; 134: 930-934.
- Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC et al..** A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J. Infect. Dis. 1990; 161: 618-625.
- Grayston JT, Kuo C-C, Campbell LA et al..** *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for Chlamydia sp. strain infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. JAMA 1992; 268: 68-72.
- Grayston JT, Kuo C-C, Campbell LA et al..** *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for Chlamydia sp. strain TWAR. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39: 88-90.
- Grayston JT, Kuo CC, Cuolson AS et al..** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. Circulation 1995; 92: 3397-4000.
- Grönhagen-Riska C, Saikku P, Riska H et al..** Antibodies to TWAR – a novel type of Chlamydia – in sarcoidosis, p. 297-301. In Grassi C, Rizzato G, Pozzi E (ed.), Sarcoidosis and other granulomatous disorders. Excerpta Medica, Amsterdam.

- Gupta S, Leatham EW, Carrington D et al..** Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events, and Azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997; 96: 404-407.
- Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A et al..** Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes: ROXIS pilot study. *Lancet* 1997; 350: 404 - 407.
- Hahn DL, Dodge RW, Golubjatnikov R.** Association of *C. pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA* 1991; 266: 225-230.
- Haidl S, Ivarsson S, Bjerre I et al..** Guillain-Barré syndrome after *Chlamydia pneumoniae* infection. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 576-577.
- Hansson GK.** Immune response in atherosclerosis. In: Hansson G, Libby P, eds. *Immune Functions of the Vessel Wall*. Amsterdam, Netherlands; Harwood Academic Publishers GmbH; 1996: 143-158.
- Hansson GK, Holm J, Holm S et al..** T-lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 94: 4624-4646.
- Hansson GK, Holm J, Jonasson L.** Detection of activated T-lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* 1989; 135: 169-175.
- Hashigucci K, OgawaH, Suzuki T et al..** Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15: 570-571.
- Hochleitner BW, Hochleitner EO, Obrist P et al..** Fluid shear stress induces heat shock protein expression in endothelial cells in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 617-623].
- Hoppichler F, Lechleitner M, Traweger C et al..** Changes of serum antibodies to heat-shock protein 65 in coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1996; 126: 333-338.
- Hu H, Pierce GN, Zhong G.** The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *C. pneumoniae*. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 747-753.
- Huittinen T, Leinonen M, Tenkanen L et al..** Autoimmunity to Human Heat-Shock Protein 60, *Chlamydia pneumoniae* Infection, and Inflammation in Predicting Coronary Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22: 431-437.

- Iijima Y, Miyashita N, Kishimoto T et al.** Characterization of *Chlamydia pneumoniae* Species-specific Proteins in Humans. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 583-588.
- Jackson LA, Smith NL, Heckbert SR et al.** Lack of association between first myocardial infarction and past use of erythromycin, tetracycline, or doxycycline. Emerg. Infect. Dis. 1999; 5: 281-284.
- Jantos CA, Heck S, Roggendorf R et al.** Antigenic and Molecular Analyses of Different *Chlamydia pneumoniae* Strains. J. Clin. Microbiology 1997; 35 (No. 3): 620-623.
- Jantos CA, Nesseler A, Waas W et al.** Low Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in Atherectomy Specimens from Patients with Coronary Heart Disease. Clin. Infect. Dis. 1999; 28: 988-992.
- Kalayoglu MV, Indrawati, Morrison RP.** Chlamydial virulence in atherogenesis: The role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. J. Infect. Dis. 2000; 181 (Suppl. 3): 483-490.
- Kaufmann SHE.** Heat shock proteins and the immune response. Immunology Today 1990; 11: 129-136.
- Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH et al.** Chlamydial Heat Shock Protein 60 Localizes in Human Atheroma and Regulates Macrophage Tumor Necrosis Factor- α and Matrix Metalloproteinase Expression. Circulation 1998; 98: 300-307.
- Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA et al.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. J. Vasc. Surgery 1997; 26: 29-31.
- Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA et al.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. J. Vasc. Surg. 1997; 26: 29-31.
- Kuo CC, Gown AM, Benditt EP et al.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. Arterioscler. Thromb. 1993; 13: 1501-1504.

- Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA et al..** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92: 6911-6914.
- Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA et al..** *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8:451-461.
- Kuo CC, Shor A, Campbell LA et al..** Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerotic Lesions of Coronary Arteries. J. Infect. Dis. 1993; 167:841-849.
- Kutlin A, Roblin PM, Hammerschlag MR.** Antibody Response to *Chlamydia pneumoniae* Infection in Children with Respiratory Illness. J. Infect. Dis. 1998; 177: 720-724.
- Laitinen K, Laurila A, Phyh  l   L et al..** *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aorta of rabbits. Infect. Immun. 1997; 65: 4832-4835.
- Leinonen M.** *Chlamydia pneumoniae* and Other Risk Factors for Atherosclerosis. J. Infect. Dis. 2000; 181: 414-416.
- Leinonen M, Kerttula Y, Weber T et al..** Acute phase response in *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. In: Program and abstracts of the 5th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Oslo, 1991: 86.
- Linnanmäki E, Leinonen M, Mattila K et al..** *Chlamydia pneumoniae* - Specific Circulating Immune Complexes in Patients With Chronic Coronary Heart Disease. Circulation 1993; 87:1130-1134.
- Maass M, Gieffers J.** Prominent serological response to *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular disease. Immunol. & Infect. Dis. 1996; 6: 65-70.
- Markus HS, Sitzler M, Carrington D et al..** *Chlamydia pneumoniae* Infection and Early Asymptomatic Carotid Atherosclerosis. Circulation 1999; 100: 832-837.
- Marrie TJ, Marczy M, Mann OE et al..** Culture-negative endocarditis probably due to *Chlamydia pneumoniae*. J. Infect. Dis. 1990; 161: 127-129.
- Meier CR, Derby LE, Jick SS et al..** Antibiotics and risk of subsequent first-time acute myocardial infarction. JAMA 1999; 281: 427-431.
- Melnick SL, Shahar E, Folsom AR et al..** Past infection by *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR and Asymptomatic Carotid Atherosclerosis. Am. J. Med. 1993; 95:499-504.

- Michel D, Antoine JC, Pozzetto B et al.** Lumbosacral meningoradiculitis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1992; 55: 511.
- Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF et al.** Increased Incidence of Chlamydia Species Within the Coronary Arteries of Patients With Symptomatic Atherosclerotic Versus Other Forms of Cardiovascular Disease. J. Am. Coll. Cardiol. 1996; 27: 1555-1561.
- Munk ME, Schoel B, Modrow S et al.** Cytolytic T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self epitopes shared by the mycobacterial and human 65 kDa heat-shock protein. J. Immunol. 1989; 143: 2844-2849.
- Murray LJ, O'Reilly DPJ, Ong GML et al.** *Chlamydia pneumoniae* antibodies are associated with an atherogenic lipid profile. Heart 1999; 81: 239-244.
- Odeh M, Oliven A.** Chlamydial infections of the heart. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992; 11: 885-893.
- Ogawa H, Hashigucci K, Kzuyama Y.** Recovery of *Chlamydia pneumoniae* in six patients with otitis media and effusion. J. Laryngol. Otol. 1992; 106: 490-492.
- Olaimatu SM, Horne BD, Mullen K et al.** Serum Immunoglobulin G Antibodies to Chlamydial Heat-Shock Protein 60 but Not to Human and Bacterial Homologs Are Associated With Coronary Artery Disease. Circulation 2002; 106: 1659-1663.
- Ophuls W.** Atherosclerosis and cardiovascular disease: Their relation to infectious diseases. JAMA 1921; 76: 700-701.
- Patel P, Mendall MA, Carrington D et al.** Association of Helicobacter pylori and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. BMJ 1995; 311: 711-714.
- Patnode D Wang SP, Grayston JT.** Persistence of *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR micro-immunofluorescent antibody. Chlamydial infections. Bowie WR, Caldwell HD, Jones RP et al., eds.. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 406-409.
- Peeling RW, Bailey RL, Conway DJ et al.** Antibody response to the 60 kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma. J. Infect. Dis. 1998; 177: 256-259.

- Peeling RW, Wang SP, Grayston JT et al..** *Chlamydia pneumoniae* Serology: Interlaboratory Variation in Microimmunofluorescence Assay Results. J. Infect. Dis. 2000; 181 (Suppl. 3): 426-429.
- Pockley AG.** Heat-Shock Proteins, Inflammation, and Cardiovascular Disease. Circulation 2002; 105: 1012-1017.
- Puolakkainen M, Kuo CC, Shor A et al..** Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 2212-2214.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ et al..** Inflammation, Aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N. Engl. J. Med. 1997; 336: 973-979.
- Ridker PM, Kundsinn RB, Stampfer MJ et al..** Prospective Study of *Chlamydia pneumoniae* IgG Seropositivity and Risks of Future Myocardial Infarction. Circulation 1999; 99: 1161-1164.
- Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993; 362: 801-809.
- Ross R, Glomset JA.** Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science 1973; 180: 1332-1339.
- Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L et al..** Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infection as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. Intern. Med. 1992; 116: 273-278.
- Saikku P, Mattila K, Nieminen MS et al..** Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 1988; 2: 983-986
- Schett G, Xu Q, Amberger A et al..** Autoantibodies against heat-shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity. J. Clin. Invest. 1995; 96: 2569-2577.
- Thom DH, Wang SP, Grayston JT et al..** *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR Antibody and Angiographically Demonstrated Coronary Artery Disease. Arterioscler. Thromb. 1991; 11: 547-551.
- Toye B, Laferriere C, Claman P et al..** Association between antibody to the chlamydial heat-shock-protein and tubal infertility. J. Infect Dis. 1993; 168: 1236-1240.

- Wagels G, Rasmussen S, Timms P.** Comparison of *Chlamydia pneumoniae* isolates by Western Blot (Immunoblot) analysis and DNA sequencing of the omp 2 gene. *Journal of Clinical Microbiology* (1994) 32: 2820-2823.
- Wang S.** The Microimmunofluorescence Test for *Chlamydia pneumoniae* Infection: Technique and Interpretation. *J. Infect. Dis.* 2000; 3: 421-425.
- Wang P, Ba ZF, Chaudry IH.** Administration of TNF- α in vivo depresses endothelium dependant relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1994; 266: H 2535-H 2541.
- Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA et al..** Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 957 - 962
- Wong YK, Gallagher PJ, Ward ME.** *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Heart* 1999; 81: 232-238.
- World Health Organization:** Sexually Transmitted Diseases. Press Release, WHO/64, 25th August 1995.
- Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ et al..** Induction of Arteriosclerosis in Normocholesterolemic Rabbits by Immunization With Heat Shock Protein 65. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1992; 12: 789-799.
- Xu Q, Kleindienst R, Schett G et al..** Regression of arteriosclerotic lesions induced by immunization with heat-shock protein 65 - containing material in normocholesterolemic, but not hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 1996; 123: 145-155.
- Xu Q, Luef G, Weimann S et al..** Staining of Endothelial Cells and Macrophages in Atherosclerotic Lesions With Human Heat-Shock Protein-Reactive Antisera. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993; 13: 1763-1769.
- Xu Q, Schett G, Seitz CS et al..** Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody on stressed aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 1994; 75: 1078-1085.
- Xu Q, Wick G.** The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol. Med. Today* 1996; 2: 372-379.
- Xu Q, Willeit J, Marosi M et al..** Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet* 1993; 341: 255-259.
- Young RA, Elliot TJ.** Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* 1989; 59:5-8.

Zügel U, Kaufmann SHE. Role of Heat-Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 1999; 12: 19-39.

ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

9. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich ganz herzlich Herrn PD Dr. C. A. Jantos für die ständige, gute und vertrauensvolle Betreuung meiner Arbeit danken. Er war für mich - trotz Veränderung seiner persönlichen beruflichen Situation und dem damit verbundenen Wohnortwechsel – ein stets erreichbarer Ansprechpartner. Zudem ermöglichte er mir die internationale Präsentation meiner Arbeit. Die Ergebnisse fanden Eingang in folgende Veröffentlichung:

Jantos CA, Krombach C, Wuppermann FN, Gardemann A, Bepler S, Asslan H, Hegemann JH and Haberbosch W. Antibody Response to 60 kDa Heat-Shock Protein of *Chlamydia pneumoniae* in Patients with Coronary Artery Disease. The Journal of Infectious Diseases 2000; 181: 1700-5.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. F. N. Wuppermann danken, der mir gerade während des experimentellen Abschnittes meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. So wies er mich u.a. in die Technik der Chlamydienkultur ein und stellte mir außerdem das zur Durchführung der Immunoblot-Untersuchungen notwendige rekombinante Hitze-Schock-Protein 60 zur Verfügung.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik I, Abteilung für Kardiologie und Angiologie Gießen danken, mit deren Unterstützung diese Arbeit erst durchführbar war. Ganz besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. Haberbosch, der sich hierbei hauptverantwortlich zeigte.

In diesen Rahmen möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. Gardemann (zum damaligen Zeitpunkt Institut für Klinische Chemie der JLU Gießen) danken, mit dessen kompetenter Hilfe die statistische Auswertung dieser Arbeit ermöglicht wurde.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. G. Schiefer sowie Herrn Dr. U. Schummer, die für mich am Institut für Medizinische Mikrobiologie Gießen während der Zeit des experimentellen Abschnittes meiner Arbeit neben Herrn PD Dr. C. A. Jantos immer hilfsbereite und kompetente Ansprechpartner waren.

Weiterhin möchte ich Frau Gottsmann, Frau Kröner und Frau Haacke aus dem Sekretariat im Institut für Medizinische Mikrobiologie ebenso wie auch allen medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie Giessen danken, mit denen stets eine gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Neben- und Miteinander möglich war.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die anhaltende Unterstützung und Geduld danken, mit Hilfe derer die Durchführung einer solchen Arbeit erst möglich werden konnte.

10. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Cathrin Krombach
geboren am: 05. Februar 1975 in Gießen
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
Anschrift: Theodor-Heuss-Str. 9
35415 Pohlheim
Telefon: 06403 / 9795249

Schul Ausbildung

08/1981 – 07/1985 Grundschole Pohlheim
09/1985 – 07/1994 Herderschole Gießen
Abschluss:
allgemeine Hochschule reife (Note 1,0) mit Latinum

Hochschulausbildung

10/1994 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
09/1996 Ärztliche Vorprüfung
09/1997 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2000 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2001 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

01.06.2001 – 30.11.2002 Ärztin im Praktikum am Uni-Klinikum Gießen /
Zentrum für Innere Medizin / Med. Klinik II /
Chefarzt Prof. Dr. med. W. Seeger
seit 01.12.2002 Assistenzärztin am Uni-Klinikum Gießen /
Zentrum für Innere Medizin / Med. Klinik I
(Abtlg. Kardiologie und Angiologie) /
Chefarzt Prof. Dr. med. H. Tillmanns